



Universidade de Aveiro
2009

Departamento de Biologia

**Elisabeth Vieira Costa ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DOIS
EXTRACTOS VEGETAIS CONTRA *S. AUREUS***



Universidade de Aveiro
2009

Departamento de Biologia

**Elisabeth Vieira Costa ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DOIS
EXTRACTOS VEGETAIS CONTRA *S. AUREUS***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Dr^a. Etelvina Figueira, Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e co-orientação do Dr. António Ferreira Neves, Farmacêutico especialista em Análises Clínicas.

Dedico este trabalho ao meu marido e sogros pelo apoio e compreensão incansável. À memória do meu irmão, Anthony Costa.

o júri

presidente

Prof. Doutora Odete Abreu Beirão Da Cruz E Silva

Professora auxiliar da Secção Autónoma Das Ciências Da Saúde da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Etelvina Maria De Almeida Paula Figueira

Professora auxiliar do Departamento de Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Fernando José Mendes Gonçalves

Professor associado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutor António Ferreira Neves

Farmacêutico Especialista em Análises Clínicas, Direcção Avelab

agradecimentos

À Professora Doutora Etelvina Figueira, orientadora, pela disponibilidade, dedicação que sempre demonstrou, pela sua atenção.

Ao Dr. António Ferreira Neves, co-orientador, pela generosidade e preocupação que estiveram sempre presentes.

À Gizela Silva pela partilha dos seus conhecimentos; pela sua amizade.

À Ingrid pela sincera amizade.

À Júlia pelo estímulo incessante e encorajador.

À Raquel Diaz pela partilha e troca de ideias; pelo seu companheirismo.

Aos meus amigos que sempre acreditaram em mim.

Ao meu marido, Carlos Marquez, pela paciência e carinho em todos os momentos.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.....Obrigada!

palavras-chave

Camellia sinensis; *Matricaria chamomilla*; *Staphylococcus aureus* MRSA; Vancomicina; Penicilina G; Oxacilina; actividade antibacteriana; interacção; método DAA

resumo

Camellia sinensis e *Matricaria chamomilla* são duas plantas muito utilizadas na medicina popular de civilizações distintas para o tratamento de diversas patologias. Os antibióticos penicilina G, oxacilina e vancomicina são os mais recorrentes no tratamento de infecções por *S. aureus*. A resistência à meticilina induz a multirresistência de *S. aureus*. Determinou-se um perfil de resistências de isolados de *S. aureus* em ambulatório aos antibióticos. Avaliou-se a actividade antibacteriana dos extractos etanólico brutos (EEB) pelo método DAA (*decimal assay for additivity*). Este método permite avaliar a interacção dos extractos com cada um dos antibióticos. Os resultados revelaram que ambos os extractos possuem uma actividade antibacteriana contra MRSA. *C. sinensis* expressa melhor uma interacção sinérgica que *M. chamomilla*.

A avaliação da interacção extracto-antibiótico de cada uma destas espécies vegetais sugere a necessidade de estudos complementares considerando o isolamento de substâncias responsáveis pela actividade antibacteriana, o estudo do mecanismo envolvido na modelação da multirresistência e a realização de testes toxicológicos para viabilizar a sua utilização no tratamento de patologias provocadas por *S. aureus*.

keywords

Camellia sinensis, *Matricaria chamomilla*, *Staphylococcus aureus* MRSA, Vancomycin, Penicillin G, Oxacillin; antibacterial activity; interaction; DAA method

abstract

Camellia sinensis and *Matricaria chamomilla* are two herbs widely used in folk medicine of different civilizations to treat various diseases. The antibiotics penicillin G, oxacillin and vancomycin are the most frequent in the treatment of infections with *S. aureus*. The methicillin resistance induces multidrug resistance of *S. aureus*. It was determined a resistance profile of isolates of *S. aureus* in outpatient antibiotic. We evaluated the antibacterial activity of crude ethanolic extracts (CEE) through the method DAA (decimal assay for additivity). This method allows to evaluate the interaction of extracts with each of the antibiotics. The results showed that both extracts have antibacterial activity against MRSA. *C. sinensis* have shown better synergistic interaction than *M. chamomilla*.

The evaluation of the interaction antibiotic-extract of each of these species suggests the need for further studies considering the isolation of substances responsible for antibacterial activity, the study of the mechanism involved in the modeling of multidrug resistance and drug testing to enable its use in the treatment of diseases caused by *S. aureus*.

Índice geral

Índice geral	i
Índice de figuras	iv
Índice de tabelas	v
Abreviaturas	vi
Capítulo I: <i>Staphylococcus aureus</i>: de comensal a patogénico	1
1. Introdução	1
2. <i>Staphylococcus aureus</i> : uma perspectiva histórica	1
3. Identificação e caracterização	2
4. De comensal a agente patogénico	3
5. Mecanismos de patogenecidade de <i>S. aureus</i>	4
i. Factores de virulência	4
a. Adesão da bactéria	5
b. Evasão do sistema imunológico	5
c. Invasão tecidual	7
ii. Patogenicidade de <i>S. aureus</i> MRSA	7
6. A problemática da multirresistência de <i>S. aureus</i>	8
i. Antibióticos β -lactâmicos	9
a. Penicilinas	10
b. Cefalosporinas	11
ii. Glicopéptidos	11
iii. Aminoglicosídeos	12
iv. Quinolonas	13
v. Sulfonamidas e trimetopim	14
7. Epidemiologia de <i>S. aureus</i> na Europa e no mundo	15
i. EARSS e a ocorrência de estirpes resistentes em Portugal	15
ii. Incidência de estirpes MRSA na América do Norte	17
iii. Incidência de estirpes MRSA na Austrália e Ásia	18
8. Desenvolvimento de vacinas antiestafilocócicas	18
i. Produtos de vacinação activa	18
ii. Produtos de vacinação passiva	19
Capítulo II: Plantas medicinais – tradições do passado, drogas do futuro	21
1. Introdução	21
2. As plantas e a medicina tradicional	22
3. As terapias naturais em Portugal	22

i. Legislação sobre medicamentos e fitoterapia.....	23
ii. Medicamentos em Portugal.....	23
iii. Aprovação de medicamentos	24
iv. Medicamentos de origem vegetal na Europa.....	24
4. Importância das plantas na descoberta de novas drogas.....	25
5. Das plantas medicinais aos medicamentos	26
6. Princípios activos vegetais mais importantes	27
i. Fenóis simples	27
ii. Quinonas.....	28
iii. Flavonóides.....	29
iv. Taninos	29
v. Terpenos	30
vi. Alcalóides.....	30
7. Mercados e consumidores	31
8. <i>Matricaria chamomilla</i> e <i>Camellia sinensis</i>: origens, tradição e terapêutica	32
Capítulo III: Avaliação da interacção dos extractos brutos com os antibióticos	35
1. Introdução.....	35
2. Compostos vegetais: agentes moduladores da multirresistência bacteriana.....	35
3. Compostos vegetais com actividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> ..	37
4. Objectivos	38
5. Material e métodos	39
i. Identificação dos isolados bacterianos de <i>S. aureus</i>	39
a. Coloração de Gram	39
b. Cultura em meio de Chapman	40
c. Teste da catalase	40
d. Teste da coagulase	40
ii. Teste de sensibilidade a antimicrobianos	41
iii. Avaliação da actividade antibacteriana de extractos vegetais brutos.....	43
iv. Avaliação da interacção entre os extractos e antibióticos.....	45
a. Determinação do Factor Biológico Equivalente (FBE)	45
b. Interação dos extractos vegetais com os antibióticos	47
Resultados e discussão	49
i. Origem dos isolados de <i>S. aureus</i> e resistência à metilina	49
ii. Perfil de resistências de isolados de <i>S. aureus</i>	50

iii. Avaliação da actividade antibacteriana dos extractos vegetais.....	51
iv. Avaliação da interacção entre os extractos vegetais e os antibióticos	53
6. Conclusão:	56
ANEXO I	34
Bibliografia	65

Índice de figuras

Figura I.1: A - Característica de <i>S. aureus</i> na coloração de Gram.....	3
Figura I.2: Principais factores de virulência segregados durante o mecanismo de patogenicidade de <i>S. aureus</i>	5
Figura I.3: Principais alvos da acção dos antibióticos numa célula bacteriana.	9
Figura I.4: Inactivação do anel β -lactâmico pela acção de uma β -lactamase.	10
Figura I.5: Complexação dos terminais D-alanil-D-alanina do peptidoglicano pela vancomicina.....	12
Figura I.6: Alteração enzimática do antibiótico amicacina por três processos: acetilação, fosforilação e adenilação.	12
Figura I.7: Cronologia do desenvolvimento e descoberta das diferentes gerações das quinolonas.....	13
Figura I.8: Esquema da via biossintética do ácido fólico e locais de acção dos antibióticos sulfametaxazol e trimetoprim.....	15
Figura I.9: <i>S. aureus</i> : proporção invasiva de isolados resistentes à oxacilina (MRSA) em 2007.	17
Figura II.1: Estrutura química de alguns compostos fenólicos simples: A – ácido caféico, B – Catecol.....	28
Figura II.2: Estrutura química básica do grupo das quinonas.....	29
Figura II.3: A catequina é um exemplo de um composto flavonóide.....	29
Figura II.4: Exemplos de tanino hidrolizado (A) e condensado (B).	30
Figura II.5: Exemplo de dois terpenóides: A – mentol, B – artemisina.....	30
Figura II.6: A berberina é um exemplo do grupo dos alcalóides.....	31
Figura II.7: Consumo de fitofármacos na Europa: quota de mercado 2001.....	32
Figura II.8: Principais compostos fenólicos presentes no chá verde.....	33
Figura II.9: Principais constituintes químicos nas flores da camomila.	34
Figura III.1: Acção de fitocompostos como agentes modificadores da resistência bacteriana.....	36
Figura III.2: Origem biológica dos isolados de <i>S. aureus</i>	49
Figura III.3: Perfil de resistências de isolados de <i>S. aureus</i>	50
Figura III.4: Interação entre: camomila:vancomicina (A); camomila:oxacilina (B); camomila:penicilina (C).....	54
Figura III.5: Interação entre: chá verde:vancomicina (A); chá verde:oxacilina (B); chá verde:penicilina (C).	55

Índice de tabelas

Tabela III.1: Antibióticos testados para estirpes de <i>S. aureus</i>	42
Tabela III.2: Misturas decimais utilizadas no método DAA.....	47
Tabela III.3: Avaliação da actividade antibacteriana do extracto de chá vermelho (25mg/mL).	52
Tabela III.4: Avaliação da actividade antibacteriana do extracto de chá verde (25mg/mL).	52
Tabela III.5: Avaliação da actividade antibacteriana do extracto de camomila (25mg/mL).	52
Tabela A: Identificação e caracterização dos isolados obtidos no ambulatório, entre Outubro e Dezembro 2008.....	58

Abreviaturas

AGAR – Australian Group on Antimicrobial Resistance

ANSORP – Asian Network for Surveillance Pathogens

ccr - gene cassette chromosome recombinase

CDC – Centers for Diseases Control and Prevention

CMI – Concentração mínima inibitória

CNISP – Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program

DNA – ácido desoxiribonucléico

EARSS – Sietema Europeu de Vigilância da Resistência aos Antimicrobianos

ECDC – Centro Europeu da Prevenção e Controlo de Patologia

EMA – Agência Europeia de Avaliação de medicamentos

ES – Enterotoxina estafilocóccicas

ESCP – European Scientific Cooperative on Phytotherapy

FV – Factores de virulência

INFARMED – Autoridade Nacional do medicamento e Produtos de Saúde

INSA – Instituto nacional de Saúde Ricardo Jorge

MR – Estirpes multirresistentes

NCCLS – National Committee for Clinical laboratory Standards

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBP – Protein Binding Penicillin

PVL – leucotoxina Panton-Valentine

ROS – Espécies reactivas de oxigénio

SCCmec - gene staphylococcal chromosome cassette mec

TSST – Toxina da síndrome tóxica

1. Introdução

O Homem é um dos reservatórios naturais de *S. aureus* cujo principal nicho ecológico são as narinas anteriores. No entanto, apesar de ser uma bactéria comensal pode tornar-se no principal agente etiológico nosocomial e no ambatório. É capaz de provocar uma variedade de infecções desde pneumonias a intoxicações alimentares (Gordon, 2008).

O sucesso de *S. aureus* como agente patogénico está na produção de diversos factores de virulência, que também proporcionam o desenvolvimento da resistência múltipla a antibióticos. O aumento do número de estirpes de *S. aureus* resistente à meticilina tornou-se num sério problema clínico e epidemiológico, uma vez que a resistência de *S. aureus* à meticilina implica a resistência a todos os antibióticos β -lactâmicos, em que alguns casos a vancomicina é a única possibilidade no tratamento de infecções provocadas por *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA).

Estão a ser implementadas diversas estratégias que permitirão a diminuição da incidência de infecções provocadas por *S. aureus*. O “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) está direccionado na prevenção da transmissão de agentes patogénicos, nomeadamente nos hospitais. A descolonização nasal com a aplicação de agentes antibacterianos sistémicos ou tópicos é outra estratégia que permitirá a diminuição de portadores de *S. aureus* que, consequentemente conduzirá a uma diminuição da incidência de infecções por *S. aureus*. A indústria farmacêutica está direccionada para o desenvolvimento de vacinas anti-estafilocócicas, que actualmente são utilizadas nos animais direccionadas para o tratamento de mastites bovinas e o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de infecções estafilocócicas.

2. *Staphylococcus aureus*: uma perspectiva histórica

S. aureus foi reconhecido como o principal agente patogénico pela primeira vez em 1880 por Sir Alexander Ogston, em que era a principal causa de supurações (Gordon, 2008). A sua virulência fora constatada em 1941, quando Skinner e Keefer reportaram uma taxa de mortalidade de 82% estava associada a bacteremias provocadas por *S. aureus* em 122 pacientes no hospital da cidade de Boston (Archer, 1998). Desde então

S.aureus é um agente patogénico bem sucedido que pode provocar epidemias de doenças invasivas, apesar de ser uma bactéria comensal. Ao longo dos últimos 100 anos, *S. aureus* tem provocado ciclos de focos de infecções em hospitais e na comunidade (Shinefield, 2009).

Os tempos anteriores à era antibiótica foram marcados por muitas infecções invasivas estafilocócicas que resultaram numa elevada mortalidade (Shinefield, 2009). Este devastador efeito foi aliviado através da introdução da penicilina na década de 1940. No entanto, até ao final da década de 1950, aproximadamente 50% dos isolados hospitalares tornaram-se resistentes à penicilina (Shinefield, 2009). Posteriormente, os derivados semi-sintéticos da penicilina, como a meticilina e a oxacilina, foram aplicados no tratamento de infecções provocadas por *S. aureus* resistentes à penicilina. Em poucos anos, surgiram estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina, o que obrigou à escolha da vancomicina como antibiótico de eleição para o tratamento de infecções por *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Actualmente são cada vez mais frequentes as estirpes de *S. aureus* que apresentam resistência intermediária à vancomicina (VISA) e já foram reportados casos, embora raros, de estirpes resistentes à vancomicina (VRSA) (Gold, 2009).

Sendo *S. aureus* uma bactéria que está a desenvolver múltiplas resistências aos antibióticos disponíveis. O exacto mecanismo que conduz à epidemia de doenças virulentas não é totalmente compreendido (Shinefield 2009). Portanto, teremos de ser vigilantes sobre os factores ambientais que facilitam a sua propagação e além disso devem ser compreendidos os mecanismos que conduzem a sua virulência e transmissão. Com estas informações poderá ser possível desenvolver uma vacina que irá prevenir endemias e epidemias da doença estafilocócica.

3. Identificação e caracterização

As bactérias do género *Staphylococcus* são cocos de Gram positivo, com aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, não esporulados e geralmente não encapsulados. Podem apresentar-se em diversas formas desde cocos isolados, em pares, em curtas cadeias ou agrupados em forma de cacho (Figura I.1-a). Todas as espécies de estafilococos são catalase positiva e oxidase negativa. Este género pertence à família *Microcaceae* e actualmente é constituído por 33 espécies. A espécie de maior interesse clínico é *S. aureus*, para além de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophiticus*, que também estão frequentemente relacionados com diversas infecções nosocomiais e em ambulatório.

As estirpes bacterianas de *S. aureus* crescem a um pH de 7 e a uma temperatura óptima de 37°C. As colónias de *S. aureus* são arredondadas, lisas e brilhantes e apresentam uma coloração que varia do cinzento até o amarelo dourado. Em torno das colónias de *S. aureus*, quando inoculado em gelose de sangue, desenvolve-se um halo de hemólise (Figura I.1-b). O meio de manitol salgado (7,5% NaCl) é um meio selectivo para *S. aureus*, uma vez que consegue fermentar o manitol, produzindo ácido láctico. As elevadas concentrações de cloreto de sódio estimulam a produção de coagulase, enzima que caracteriza a espécie.

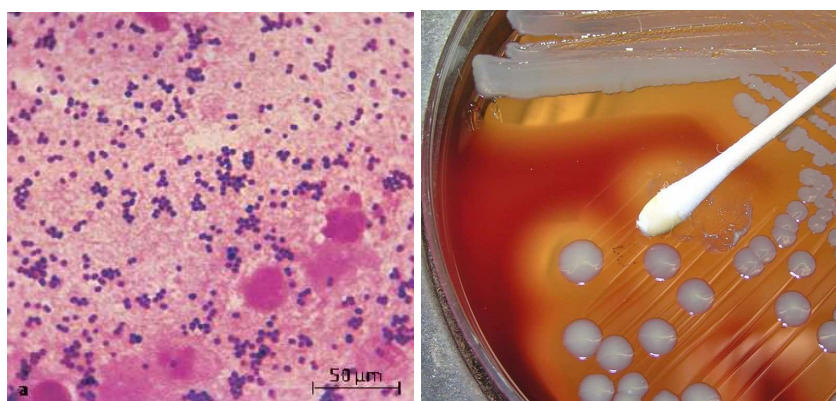


Figura I.1: A - Característica de *S. aureus* na coloração de Gram (Adaptado de Kayser, (2005)). B – Aspecto das colónias e o halo de α -hemólise em meio de gelose de sangue.

4. De comensal a agente patogénico

A distribuição de *S. aureus* é muito ampla, uma vez que tem a capacidade de resistir à dissecação e a temperaturas baixas, podendo permanecer viável por longos períodos em partículas de poeira (Santos, 2007). *S. aureus* habitualmente faz parte da flora normal, sendo cerca de 30% dos adultos saudáveis portadores desta bactéria (Simor e Daneman, 2009). É uma bactéria que coloniza diversas áreas anatómicas, no entanto os locais de maior incidência são as narinas anteriores (Simor e Daneman, 2009). A colonização assintomática por *S. aureus* é comum e surge como um pré-requisito para o desenvolvimento de infecção por *S. aureus* (Simor e Daneman, 2009), uma vez que um portador de *S. aureus* passa a ser o veículo de transferência da bactéria no mecanismo de infecções por contacto directo. Na rotina hospitalar, nomeadamente nas maternidades e unidades de cuidados intensivos, é importante o isolamento de pacientes portadores de *S. aureus*, por serem um factor de risco para os pacientes imunodeprimidos (Santos, 2007).

O *S. aureus* é frequentemente isolado de feridas cirúrgicas, que podem representar focos para o desenvolvimento de infecções sistémicas. A transmissão de *S. aureus* é feita mediante as mãos ou luvas dos profissionais de saúde para os pacientes em meio hospitalar ou por fontes do meio ambiente em ambulatório. A maioria das infecções por *S. aureus* é desencadeada por fonte endógena, apesar das fontes exógenas também constituem uma fonte de infecção para indivíduos hospitalizados. A relação entre a colonização por *S. aureus* e o desenvolvimento de infecções é complexa e foi recentemente revista (Simor e Daneman, 2009). É evidente que os portadores de *S. aureus* são um factor de risco predominante para as infecções subsequentes por *S. aureus*, nomeadamente durante a hospitalização. Em 1960, Wolinsky demonstrou que a via de transmissão em ambiente hospitalar mais comum é de facto promovida pelas mãos dos profissionais de saúde (Shinefield, 2009).

Portanto *S. aureus* é uma bactéria comensal que se pode converter num agente patogénico oportunista cujas circunstâncias determinam o aparecimento de uma variedade de infecções graves. Estas infecções incluem pneumonia, mastites, infecções dermatológicas, osteomielites, endocardites e até intoxicações alimentares.

5. Mecanismos de patogenecidade de *S. aureus*

O *S. aureus* é um dos agentes infecciosos que se tem destacado ao longo da história, permanecendo como uma das principais causas de infecções bacterianas. As patologias invasivas que são provocadas por este agente patogénico variam de pequenos cortes e escoriações, facilmente tratáveis, a casos severos de bacteremia, endocardite e osteomielite. Este agente patogénico possui diversos mecanismos que circunscrevem a destruição da imunidade inata, nomeadamente no bloqueio da maioria das funções antimicrobianas dos leucócitos fagocitários e produz superantigénios que provocam infecções graves (DeLeo *et al*, 2009).

i. Factores de virulência

O sucesso de um microrganismo como agente patogénico e a sua capacidade de provocar uma variedade de infecções depende dos seus factores de virulência (FVs) (Figura I.2). Os FVs permitem ao *S. aureus* sobreviver, colonizar, proliferar e provocar infecções em células hospedeiras e são responsáveis pela: a) adesão da bactéria, b) evasão do sistema imunológico; c) invasão tecidual (Archer, 1998).

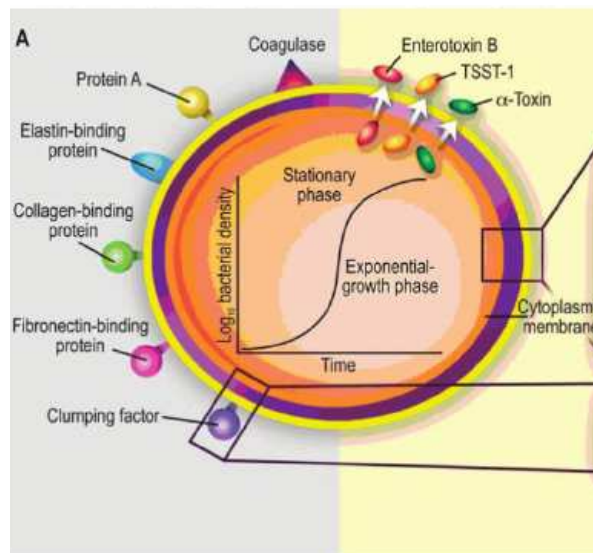


Figura 1.2: Principais factores de virulência segregados durante o mecanismo de patogenicidade de *S. aureus*. Adaptado de Gordon (2008).

a. Adesão da bactéria

O *S. aureus* possui uma classe de proteínas superficiais que promovem a adesão da bactéria aos tecidos do hospedeiro (Gordon, 2008). Estas proteínas superficiais têm a capacidade de se ligarem ao colagénio, elastina e fibronectina (Gordon, 2008). Após a adesão aos tecidos do hospedeiro ou ao material protético, a bactéria consegue proliferar e persistir em diversas formas. *S. aureus* tem a capacidade de formar biofilmes (slime) que são clinicamente importantes, uma vez que as bactérias tornam-se resistentes aos antibióticos e aos desinfetantes e permanecem muito mais tempo. Também podem permanecer no material clínico. A formação do biofilme tem sido descrita em duas etapas: a primeira envolve a ligação das bactérias a uma superfície e a segunda a multiplicação microbiana e a formação de uma matriz extracelular constituída por polissacarídeos (Gordon, 2008).

b. Evasão do sistema imunológico

A sobrevivência da bactéria durante uma infecção depende da sua capacidade de circunscrever as defesas do hospedeiro. Esta capacidade reside no facto das bactérias no geral e *S. aureus*, em particular, desenvolverem múltiplas estratégias para evitarem as defesas do hospedeiro. O *S. aureus* pode passar despercebido pelo sistema imunitário mediante a produção de cápsulas protectoras, como a cápsula de polissacarídeos ou pela formação de biofilmes (DeLeo *et al*, 2009).

As estirpes de *S. aureus* têm a capacidade de produzirem diversos exopolímeros, que em conjunto camuflam a cápsula, protegendo-as do reconhecimento pelo sistema imunológico. Algumas estirpes estão encapsuladas por uma cápsula de polissacarídeos que possui uma composição química específica que protege da fagocitose (DeLeo et al, 2009). A parede celular de *S. aureus* contém peptidoglicano que lhe confere rigidez. Os ácidos teicóicos estão ligados ao peptidoglicano, medeiam a fixação das bactérias às superfícies das mucosas e estabelecem uma ligação específica à fibronectina. A membrana citoplasmática contém proteínas, lípidos e hidratos de carbono e auxilia a fixação dos estafilococos às mucosas (Brooks, 2001). A cápsula estimula a resistência à fagocitose e a formação de biofilmes (Ferry, 2005). Aquando da ingestão pelos neutrófilos, *S. aureus* possui duas enzimas, a catalase e a superóxido dismutase, responsáveis pela eliminação de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Além disso, descobriu-se recentemente que o pigmento amarelo de *S. aureus*, um pigmento carotenóide denominado de estafiloxantina, tem uma função protectora contra ROS (DeLeo et al, 2009). *S. aureus* segrega ainda uma série de proteases, que são responsáveis pela hidrólise de proteínas antimicrobianas produzidas pelos neutrófilos.

Os mecanismos de *S. aureus* que lhe permitem a evasão do sistema de imunitário bloqueiam os receptores e os efectores envolvidos na eliminação da bactéria. *S. aureus* produz ainda toxinas que atacam directamente os leucócitos e eritrócitos, as quais incluem uma família extensa de leucocidinas (DeLeo et al, 2009). As leucocidinas lisam os leucócitos, no entanto o seu papel na virulência de *S. aureus* não é conhecida assim como a razão biológica de outras toxinas, como a α -hemolisina.

O factor de evasão mais significativo de *S. aureus* talvez seja a proteína A, uma vez que modera a resposta da imunidade adquirida mediante a interacção com a porção Fc das imunoglobulinas G, de modo a formar imunocomplexos (DeLeo et al, 2009). Deste modo, durante a patogénese, *S. aureus* é capaz de sequestrar anticorpos inespecíficos para a sua superfície protegendo-o dos ataques de imunidade adquirida.

A potenciação ou a superestimulação da resposta imunitária representa uma via de interferência com o sistema imunitário, mediante a produção de toxinas superantigénicas. Estas toxinas incluem a toxina da síndrome tóxica (TSST) e as enterotoxinas estafilocócicas (ES) (DeLeo et al, 2009). *S. aureus* produz uma variedade de toxinas extracelulares incluindo as enterotoxinas A, B, C 1-3, D, E, F, G, H e I, a toxina 1 da síndrome tóxica (TSST-1), as toxinas esfoliativas A e B e a α -toxina (Dinges, 2000). A maioria destas enzimas têm actividade superantigénica, ou seja,

estimulam a proliferação inespecífica dos linfócitos T (Balaban, 2000). A maioria das toxinas provoca uma patologia ou uma síndrome específica. A intoxicação alimentar é provocada pelas enterotoxinas, a síndrome do choque tóxico pela TSST-1 e a síndrome da pele escaldada pelas toxinas esfoliativas (Gordon, 2008).

c. Invasão tecidual

Durante o processo infeccioso, *S. aureus* produz numerosas enzimas que possuem a capacidade de invadir e destruir os tecidos do hospedeiro. As proteases estão envolvidas na evasão das defesas e na invasão dos tecidos do hospedeiro (Archer, 1998). A coagulase é uma enzima extracelular produzida por *S. aureus* que converte o fibrinogénio em fibrina insolúvel, promove a aglutinação dos estafilococos (clumping factor) e fornece protecção contra a fagocitose (Brooks, 2001). A catalase é uma enzima que promove a protecção de *S. aureus* da acção de enzimas bactericidas produzidas pelos leucócitos, como a mieloperoxidase. Existem outras enzimas produzidas pelo *S. aureus*, como a hialuronidase que hidrolisa o ácido hialurónico, facilitando a sua disseminação nos tecidos, a fibrinolisina que dissolve coágulos de fibrina, as lipases que hidrolisam os lípidos e permitem a sobrevivência dos estafilococos em regiões sebáceas (Brooks, 2001).

ii. Patogenicidade de *S. aureus* MRSA

S. aureus tem a capacidade de se adaptar à pressão selectiva exercida pelos antibióticos. A emergência de estirpes resistentes à penicilina e à meticilina foi reportada em 1948 e 1961, respectivamente (Robison, 2003). Em ambos os casos, a resistência desenvolvida foi adquirida um ano após a introdução dos antibióticos na prática clínica. Há indicações de que a epidemiologia de *S. aureus* MRSA está em expansão, sendo uma das principais causas de infecções hospitalares (Robinson, 2003). Diversas teorias apontam a origem da resistência à meticilina para: 1) o gene *mecA* emergido por recombinação homóloga entre a proteína ligadora de penicilina (PBP) e um gene de β -lactamase proveniente de um plamídeo; 2) o gene *mecA* de proveniência de espécies de estafilococos coagulase negativa, por transferência horizontal (Gilmore *et al*, 2008).

A resistência de *S. aureus* MRSA aos antibióticos β -lactâmicos é determinada pela função da PBP2' codificada pelo gene da resistência à meticilina *mecA* (Gordon, 2008). Mediante a determinação da sequência nucleotídica de uma região

cromossômica específica de uma estirpe MRSA N315 (isolada no Japão em 1982), constatou-se de que o gene *mecA* está incorporado num novo elemento genético, designado por “*staphylococcal chromosome cassette (SCC) mec*” que está integrado no cromossoma de *S. aureus* (Robinson, 2003) num local específico junto à origem da replicação (Berglund, 2005). Está comprovado que estirpes de *S. aureus* susceptíveis à meticilina podem tornar-se MRSA pela aquisição de SCC*mec* (Chongtrakool, 2006).

Todos os genomas dos *S. aureus* MRSA contêm SCC*mec* que são portadores do gene *mecA*, bem como os outros factores de virulência e resistência. A clonagem e a sequenciação de SCC*mec* de diversas estirpes MRSA constataram a presença de cinco alótipos diferentes que são designados por “SCC*mec* tipo I-V” (Berglund, 2005). Cada elemento SCC*mec* transposta uma combinação de dois componentes genéticos essenciais, designados por complexo “*gene mec*” e complexo “*gene cassette chromosome recombinase*” (*ccr*) que condiciona a classificação dos alótipos de SCC*mec* nos respectivos tipos I-V (Berglund, 2005). A maioria das linhagens das estirpes de *S. aureus* MRSA adquiridas no meio hospitalar (HA-MRSA) são portadores dos tipos I, II ou III, enquanto as estirpes de *S. aureus* MRSA adquiridas no ambulatório (CA-MRSA) são frequentemente portadores do tipo IV (Berglund, 2005). As estirpes de *S. aureus* portadores do tipo IV de SCC*mec* possuem resistência apenas a antibióticos β -lactâmicos, uma vez que o SCC*mec* tipo IV não possui genes de resistência a outros antibióticos, enquanto o SCC*mec* tipos I, II e III transposta genes de resistência acoplados para mais do que um tipo de antibiótico, e portanto são de maiores dimensões relativamente ao SCC*mec* do tipo IV (Berglund, 2005). As estirpes de *S. aureus* portadores do tipo IV de SCC*mec* possuem frequentemente a presença do gene da leucotoxina Pantón-Valentine (PVL) que lhe confere vantagem selectiva (Gordon, 2008). A expressão da toxina PVL ocorre em menos de 5% das estirpes de *S. aureus*, sendo citotóxica para os neutrófilos e provocando o aumento da permeabilidade e eventual lise celular (Gordon, 2008).

6. A problemática da multirresistência de *S. aureus*

A descoberta de antibióticos foi um dos avanços mais significativos no tratamento de infecções bacterianas. Contudo a sua introdução na prática clínica tem proporcionado o desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes, cujos principais mecanismos de resistência ainda permanecem por esclarecer. O surgimento e a propagação de microrganismos resistentes representam a convergência de diversos

factores que incluem mutações nos genes de resistência, o intercâmbio de informações genéticas entre os microrganismos e a pressão selectiva exercida sobre os microrganismos nos meios ambulatorio e hospitalar (Tenover, 2001). A prevalência global de estirpes de *S. aureus* resistentes está a aumentar de ano para ano e, portanto, a infecção causada por estirpes desta espécie representam um grave problema epidemiológico.

Os agentes antibacterianos utilizados no tratamento de infecções bacterianas estão classificados de acordo com os seus principais mecanismos de acção (Figura I.3). Podem ter uma acção bactericida (morte das bactérias) ou bacteriostática (inibição do crescimento bacteriano). As diferentes classes de antibióticos actuam sobre as bactérias em três alvos principais do metabolismo bacteriano: (1) biossíntese da parede celular, (2) síntese proteica e (3) replicação e reparação do DNA (Walsh, 2000).

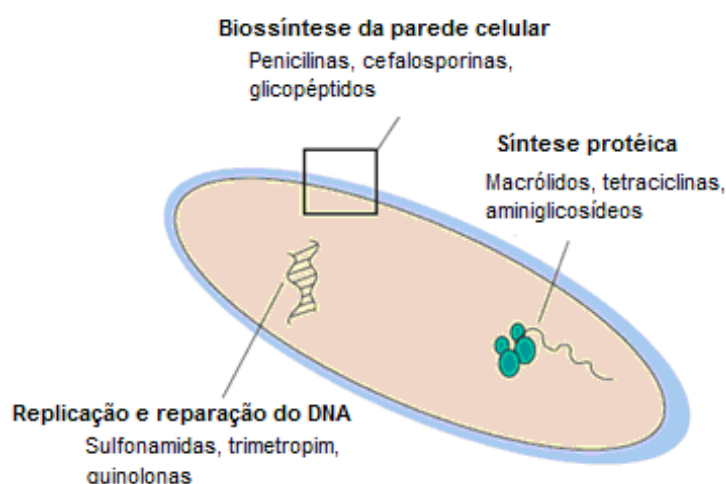


Figura I.3: Principais alvos da acção dos antibióticos numa célula bacteriana. Adaptado de Walsh (2000).

i. Antibióticos β -lactâmicos

A família dos antibióticos β -lactâmicos constitui um grupo enorme e diverso de drogas, que podem apresentar reacções adversas abrangendo uma série de efeitos secundários. Também podem interagir com outras drogas, como por exemplo aumentando o efeito anticoagulante do warfine (Gold e Pillai, 2009). Esta família de antibióticos é caracterizada quimicamente pela presença do anel β -lactâmico essencial para a sua actividade antibacteriana. São antibióticos de acção bactericida lenta que

inibem a síntese da parede celular bacteriana. O interior da membrana celular bacteriana apresenta receptores específicos, denominados de PBP (Protein Binding Penicilin), responsáveis pela etapa final da síntese do peptidoglucano. No entanto estes receptores evidenciam uma elevada afinidade pelos antibióticos β -lactâmicos e deste modo é interrompido o processo de transpeptidação (Tenover, 2006). Deste modo, a camada do peptidoglucano torna-se frágil e consequentemente ocorre a lise bacteriana. Além disso, esta família de antibióticos pode activar as enzimas responsáveis pela indução da autólise bacteriana (Prescott, 1995).

A resistência aos antibióticos β -lactâmicos é mediada pela produção de β -lactamases, enzimas responsáveis pela hidrólise do anel β -lactâmico antes da sua ligação às PBPs (Figura I.4); alteração estrutural das PBPs impedindo a sua ligação a estes antibióticos; e alterações na permeabilidade da membrana e nas bombas de efluxo.

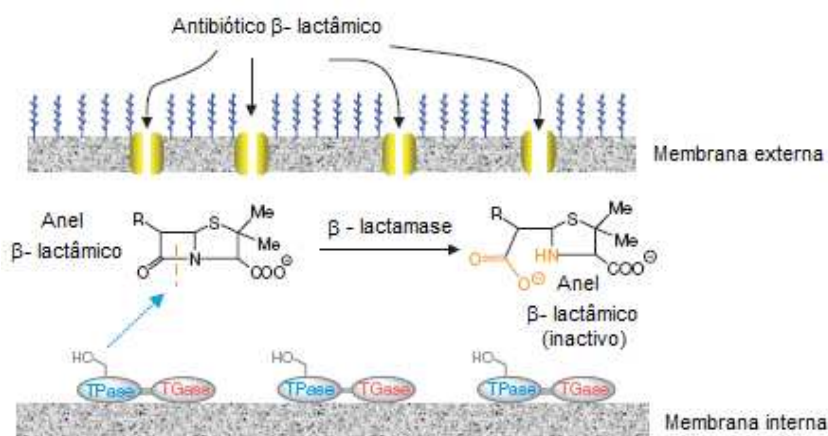


Figura I.4: Inativação do anel β -lactâmico pela acção de uma β -lactamase. Adaptado de Walsh, (2000).

a. Penicilinas

A penicilina é um antibiótico que foi introduzido na prática clínica em 1942, nomeadamente para tratar infecções provocadas por *S. aureus*. Ao longo do tempo, estas estirpes tornaram-se resistentes à penicilina e propagaram-se dos hospitais para a comunidade. Actualmente a prevalência de estirpes resistentes à penicilina é cerca de 99% (Gold e Pillai, 2009). A meticilina é uma penicilina semi-sintética que é estável contra a acção das β -lactamases. A meticilina foi introduzida na prática clínica em

1959 e em 1961, no Reino Unido, foram descobertos os primeiros isolados de *S. aureus* resistentes à meticilina.

b. Cefalosporinas

As cefalosporinas são dos antibióticos mais prescritos e possuem um efeito extraordinário com uma eficácia e segurança relativas. As cefalosporinas estão geralmente agrupadas em gerações, as quais estão relacionadas com o seu espectro de actividade antibacteriana. A primeira geração inclui a cefazolina e a cefalexina, e são as drogas de eleição para o tratamento de infecções por *S. aureus* em pacientes que não toleram as penicilinas naturais (Gold e Pillai, 2009). As cefalosporinas da segunda geração mantêm uma excelente actividade contra *S. aureus*. A terceira geração possui um espectro de actividade alargado e a quarta geração e a mais recente, mantêm utilidade clínica contra estirpes de *S. aureus* susceptíveis.

ii. Glicopéptidos

A vancomicina e a teicoplanina são antibióticos representativos da classe dos glicopéptidos utilizados contra bactérias de Gram positivo. A vancomicina é um antibiótico derivado de *Streptomyces orientalis*. Foi introduzido na prática clínica em 1958. Actualmente é utilizado principalmente no tratamento de infecções provocadas por MRSA e em pacientes alérgicos aos antibióticos β -lactâmicos (Gold e Pillai, 2009). Esta família de antibióticos inibe a síntese da parede celular mediante o bloqueio da incorporação do peptidoglicano nos terminais D-alanil-D-alanina, ligando-se se forma irreversível. As bactérias ficam com a parede celular incompleta e não resistem às pressões osmóticas (Figura I.5).

O mecanismo de resistência a estes antibióticos ainda não está totalmente esclarecido, no entanto existem estudos que relatam o aumento da síntese de D-alanil-D-alanina como um potencial mecanismo de resistência (Hiramatsu, 2001).

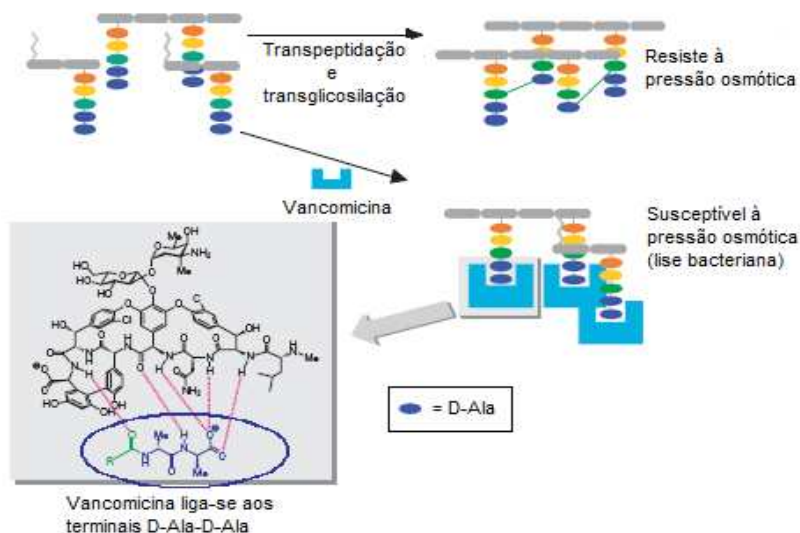


Figura I.5: Complexação dos terminais D-alanil-D-alanina do peptidoglucano pela vancomicina. Adaptado de Walsh (2000).

iii. Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são uma família de antibióticos com um largo espectro de acção. São antibióticos bactericidas e actuam frequentemente em sinergia com outros antibióticos, o que os torna uma mais valia para o tratamento de doenças infecciosas. Os aminoglicosídeos são antibióticos que inibem a síntese proteica por ligação à subunidade 30s dos ribossomas. Esta família de antibióticos penetra na célula bacteriana principalmente por transporte activo. Um dos principais mecanismos de resistência consiste na alteração do local activo do antibiótico impedindo a sua ligação ao ribossoma (Figura I.6).

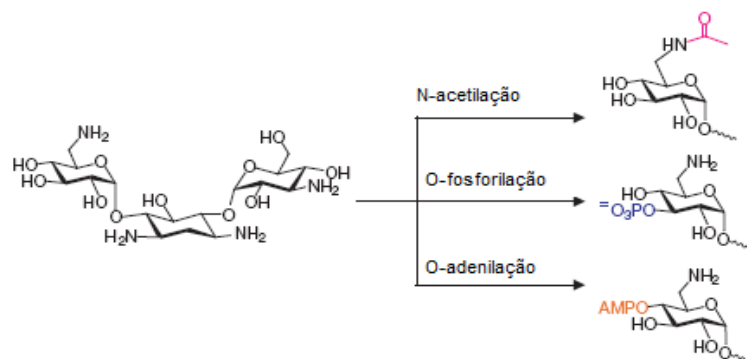


Figura I.6: Alteração enzimática do antibiótico amicacina por três processos: acetilação, fosforilação e adenilação. Adaptado de Walsh (2000).

iv. Quinolonas

A descoberta do ácido nalidíxico, em 1962, e a sua introdução na prática clínica (1967) para o tratamento de infecções do trato urinário, marcaram o início de cinco décadas de desenvolvimento das quinolonas. O ácido nalidíxico apresenta actividade antibacteriana contra bactérias de Gram negativo. No entanto, até ao desenvolvimento das fluoroquinolonas, anos 80, as quinolonas tornaram-se num grupo de antibióticos negligenciados (Emmerson e Jones, 2003). As fluoroquinolonas têm um espectro mais alargado e farmacocinética melhorado, em relação ao ácido nalidíxico. Foram cerca de cinco décadas direccionadas no desenvolvimento das quinolonas (Figura I.7).

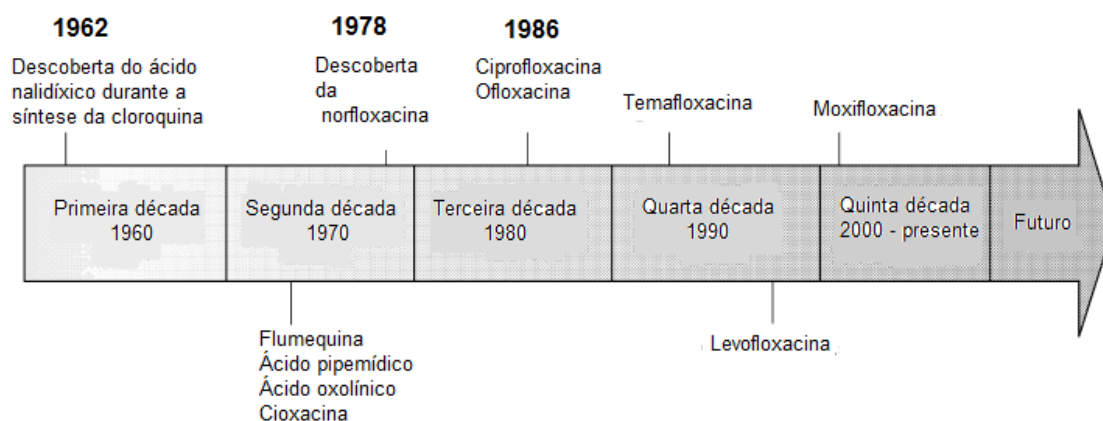


Figura I.7: Cronologia do desenvolvimento e descoberta das diferentes gerações das quinolonas. Adaptado de Emmerson e Jones (2003).

A inibição da síntese de DNA pelas quinolonas efectua-se mediante a sua ligação a duas enzimas relacionadas mas funcionalmente diferentes: a DNA girase (topoisomerase tipo III) e a topoisomerase tipo IV. A DNA girase é o principal alvo de todas as quinolonas nas bactérias de Gram negativo e a topoisomerase IV e a DNA girase é o alvo preferencial das fluoroquinolonas em bactérias de Gram positivo (Fluit *et al.*, 2001). Cada uma destas enzimas é constituída por duas subunidades designadas de A e B. Os genes *gyrA* e *gyrB* codificam as subunidades da DNA girase e os genes *parC* e *parE* codificam as subunidades da topoisomerase IV (Fluit *et al.*, 2001). Estes antibióticos ligam-se ao complexo formado entre o DNA e uma destas enzimas, interferindo directamente no processo de superenrolamento do DNA.

Os mecanismos de resistência bacteriana às quinolonas desenvolvem-se em quatro mecanismos: 1) mutações numa zona específica da DNA girase, na qual se ligam as quinolonas; 2) alteração da permeabilidade da parede celular de bactérias de

Gram negativo; 3) activação das bombas de efluxo nas bactérias de Gram positivo e de Gram negativo; e 4) presença de genes qnr localizados em elementos genéticos móveis (Fluit *et al.*, 2001).

v. Sulfonamidas e trimetropim

A potenciação da actividade do sulfametaxazol combinado com o trimetropim foi descrita por Bushby e Hitchings, em 1968. A combinação do sulfametaxazol com o trimetropim (SXT) resulta numa actividade antibacteriana de largo espectro. As sulfonamidas quando administradas isoladamente exibem uma acção bacteriostática, no entanto a combinação destes dois antibióticos numa proporção de 1:5 apresentam um efeito bactericida (Masters *et al.*, 2003). O SXT bloqueia a via biossintética da coenzima folato, indispensável para a síntese dos ácidos nucleicos e proteínas (Figura I.8). O sulfametaxazol possui uma estrutura análoga do ácido para-aminobenzóico (PABA) e inibe a síntese do ácido dihidropteróico. O trimetropim tem uma estrutura análoga à porção pteridina do ácido dihidropteróico compete com a dihidrofolato redutase e inibe a produção do ácido dihidrofolato.

Nas últimas décadas foi observado um aumento crescente da resistência bacteriana ao SXT (Masters *et al.*, 2003). A resistência bacteriana ao SXT pode ser devida ao: 1) desenvolvimento de barreiras na permeabilidade da membrana celular; 2) aumento da actividade das bombas de efluxo; e 3) alteração do local de ligação nas enzimas alvo.

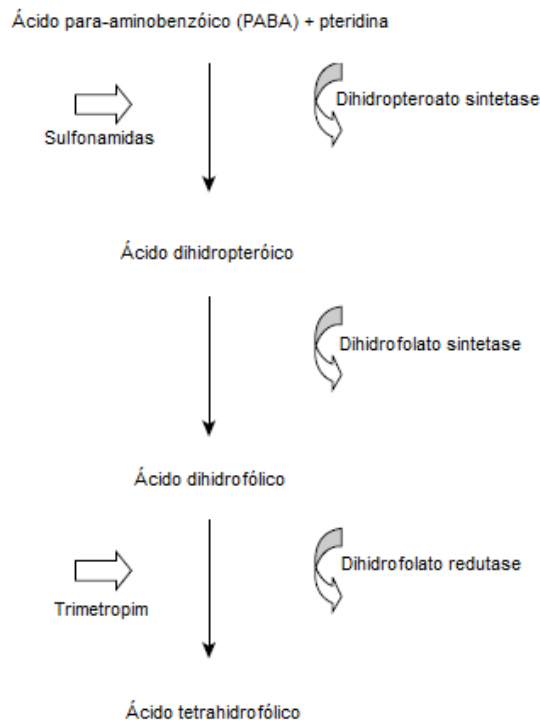


Figura I.8: Esquema da via biossintética do ácido fólico e locais de acção dos antibióticos sulfametaxazol e trimetopim. Adaptado de Masters *et al.* (2003).

7. Epidemiologia de *S. aureus* na Europa e no mundo

A monitorização da resistência aos antibióticos, especialmente em *S. aureus* é uma prioridade global, o que permite acompanhar as tendências actuais no desenvolvimento de estirpes resistentes (Gould, 2008). A prevalência é determinada em muitos níveis, tais como hospitais, países e continentes. Existe uma diversidade de projectos e entidades a trabalhar com as estirpes resistentes de *S. aureus*.

i. EARSS e a ocorrência de estirpes resistentes em Portugal

O Sistema Europeu de Vigilância da Resistência aos Antimicrobianos (EARSS) é uma iniciativa internacional fundada pelo Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Patologia (ECDC) da União Europeia. Tem como objectivo o levantamento epidemiológico da resistência aos antibióticos, a nível nacional e europeu. A nível nacional o objectivo não é apenas recolher dados sobre a resistência aos antibióticos nos países participantes, mas também o acompanhamento das novas tendências da resistência aos antibióticos. Além de *S. aureus*, são avaliados isolados invasivos de

Streptococcus pneumoniae, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Gould, 2008).

O projecto foi iniciado em 1998 e Portugal participa desde 1999 (EARSS, 2007). Em Portugal a coordenação do projecto está a cargo do Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge, em Lisboa. No site do projecto (www.earss.rivm.nl) estão disponíveis a cada ano os relatórios anuais sobre o estado de resistência a antibióticos. Os dados mais recentes são de 2007 e segundo EARSS a proporção de MRSA na Europa é elevada, especialmente nos países ocidentais e mediterrânicos (Figura I.9). Os países nórdicos apresentam uma proporção inferior a 5%, enquanto nos países mediterrânicos, Reino Unido e Irlanda, a prevalência varia entre 25% a 50%. Em França, na Turquia e na Eslovénia, as proporções de MRSA continuam em decréscimo e pela primeira vez em 2007, as proporções de MRSA na Áustria, Bulgária e Itália evidenciaram uma diminuição significativa (EARSS, 2007). Existem quatro países cujas proporções de MRSA estão acima dos 40%, que são Portugal, Malta, Grécia e Espanha (EARSS, 2007). No Norte da Europa, a prevalência de MRSA é inferior a 3%, com excepção dos Países Bálticos (8%-9%). Na Letónia, a prevalência de MRSA continua com um decréscimo acentuado, de 25% em 2004 para 8% em 2007 (EARSS, 2007). Contudo, na Noruega, Finlândia e Dinamarca observou-se um aumento significativo (EARSS, 2007).

A incidência de MRSA em Portugal tem vindo a aumentar desde 1999 de uma forma constante (EARSS, 2007). Deste modo é necessário estabelecer e manter medidas restritas de segurança nos hospitais. O projecto EARSS possui um banco de dados interactivos com informação actualizada sobre a prevalência de MRSA. Em 2007, a incidência de MRSA em hospitais nacionais varia entre 0% e 87,5% (EARSS, 2007).

Os dados reportados pela EARSS do ano 2007 confirmaram quatro estirpes com resistência intermediária à vancomicina, em França (n=1), Irlanda (n=1) e Noruega (n=2).

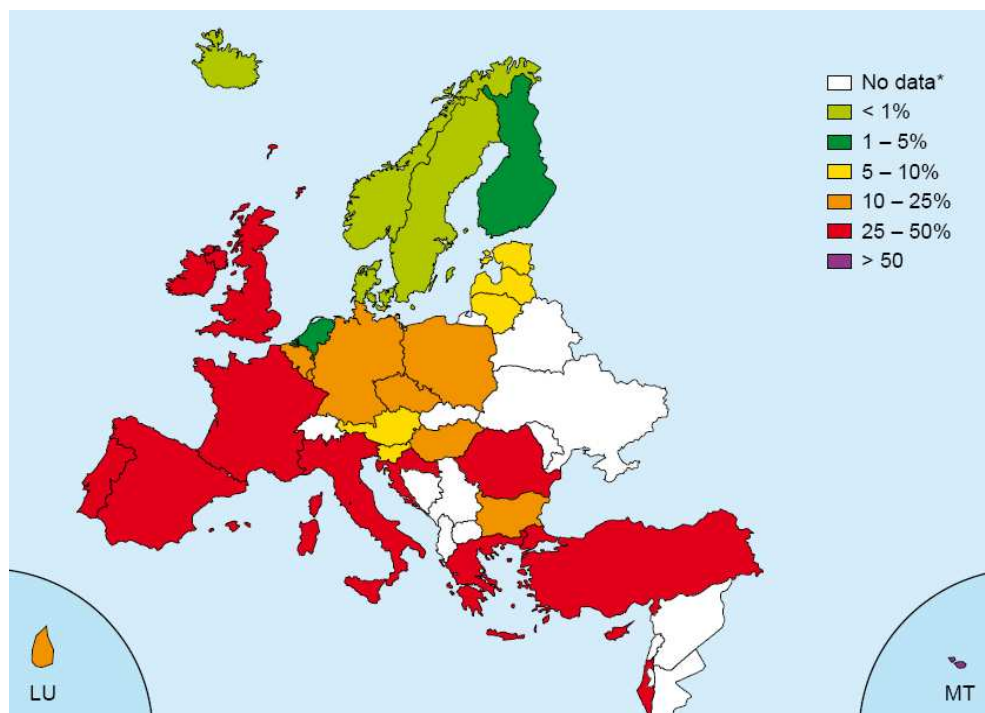


Figura I.9: *S. aureus*: proporção invasiva de isolados resistentes à oxacilina (MRSA) em 2007. Adaptado de EARSS (2007) (* estes países não reportam mais que 10 isolados MRSA)

ii. Incidência de estirpes MRSA na América do Norte

Nos Estados Unidos da América (EUA) a organização CDC (Centers of Disease Control) é a entidade responsável que aborda a problemática da resistência aos antibióticos, como também uma série de outros temas relacionados com a saúde. Esta instituição foi fundada em 1946 e trabalha em estreita colaboração com o Ministério da Saúde dos EUA. Oferece muita informação sobre MRSA para o público profissional e para a população em geral. No entanto, não emite relatórios completos sobre o estado da expansão de estirpes resistentes de *S. aureus*. Contudo, estabelece as regras para a prevenção da expansão e para os testes de sensibilidade aos antibióticos (CDC, 2008). A prevalência de MRSA nos EUA é em média 53,3%, mas os valores diferem significativamente de estado para estado.

A entidade responsável pela monitorização de estirpes resistentes no Canadá é CNISP (Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program), cujos últimos dados são de 2007. De 5995 amostras isoladas de MRSA, 69% eram de origem hospitalar e 30% da comunidade (CNISP, 2007). A prevalência de MRSA é maior no centro do Canadá, enquanto nas zonas ocidental e oriental é significativamente menor (CNISP, 2007).

iii. Incidência de estirpes MRSA na Austrália e Ásia

O grupo de trabalho AGAR (Australian Group on Antimicrobial Resistance) inclui cientistas e médicos microbiologistas que fazem a monitorização de estirpes de *S. aureus* resistentes na Austrália desde 1986. Actualmente estão envolvidas 32 instituições. A investigação está centrada principalmente em estirpes resistentes de *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella spp*, *H. influenza*, *S. pneumoniae* e *Enterococcus spp*. Além disso este grupo de trabalho está a desenvolver métodos de tipagem de estirpes resistentes. O relatório de síntese sobre a prevalência de estirpes resistentes de *S. aureus*, afirma que em 2005 a prevalência média de MRSA na Austrália foi de 31,9% (AGAR, 2005). No entanto, a incidência na parte ocidental da Austrália (22,5%) é menor relativamente à capital (43,5%).

Na Ásia a epidemiologia de estirpes resistentes está ao encargo do grupo científico internacional ANSORP (Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens). Foi fundada em 1996 e actualmente este grupo é constituído por 196 cientistas de 135 centros de pesquisa e 14 países asiáticos. O seu objectivo principal está centrado na vigilância da resistência de pneumococos em crianças. Em 2005 iniciou um projecto para a monitorização da epidemiologia e do impacto clínico das infecções provocadas por MRSA em países asiáticos. Contudo, ainda não se encontram disponíveis resultados detalhados.

8. Desenvolvimento de vacinas antiestafilocócicas

Com o desenvolvimento da análise do genoma e proteoma de *S. aureus*, o interesse dos cientistas ambiciona o desenvolvimento de vacinas eficazes contra estafilococos. A vacinação pode ser activa (administração de antígenos contra os quais o organismo cria anticorpos) ou passiva (administração de anticorpos). A maioria das bactérias de *S. aureus* são encapsuladas produzindo um polissacarídeo capsular. Existem 11 serotipos do polissacarídeo, e maioria das estirpes de *S. aureus* contêm os serotipos 5 e 8 (Schaffer e Lee, 2009). Os antígenos capsulares são dos principais alvos para o desenvolvimento da vacina.

i. Produtos de vacinação activa

A empresa farmacêutica Nabi Biopharmaceuticals criou uma vacina bivalente conjugada denominada de *StaphVAX*, que é constituída pelos polissacarídeos 5 e 8 conjugados a uma exoproteína A recombinante pseudomonal (Schaffer e Lee, 2009).

A vacina é destinada a indivíduos com uma elevada predisposição a infecções por *S. aureus*. Um grupo de investigadores da Merck está fortemente envolvido no desenvolvimento de uma vacina constituída por um antigénio capsular de *S. aureus* – IsdB (Schaffer e Lee, 2009). Esta vacina designada por V710, foi administrada em pacientes que realizaram uma cirurgia cardiotorácica e em pacientes com insuficiência renal e a fazer hemodiálise, de modo a prevenir infecções por *S. aureus* (Schaffer e Lee, 2009).

ii. Produtos de vacinação passiva

Muito promissor é a utilização de anticorpos monoclonais gerados contra a proteína superficial da *S. aureus* – clumping factor A (ClfA). A empresa farmacêutica Inibitex desenvolveu uma vacina - tefibazumab (Aurexis). Esta vacina evidenciou uma elevada eficácia na prevenção da adesão de *S. aureus* ao tecido do hospedeiro (Schaffer e Lee, 2009). Schaffer e os seus colaboradores (2006) observaram que ratos imunizados com Aurexis apresentaram menores níveis de colonização relativamente aos animais controlo.

A vacina *AltaStaph*, desenvolvida pela Nabi Biopharmaceuticals, consiste num preparado de anticorpos policlonais provenientes de voluntários imunizados com a vacina *StaphVax*. A vacina é destinada principalmente a pacientes com bacteremia.

1. Introdução

As plantas medicinais são muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de patologias é tão remoto quanto a espécie Humana. O conhecimento popular sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas das plantas, prescritos com frequência devidos aos seus efeitos medicinais. Dessa forma, os usuários de plantas medicinais mantêm a prática do consumo de fitoterápicos, credibilizando as informações terapêuticas que foram acumuladas durante séculos. Este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de investigadores em estudos de áreas multidisciplinares, como por exemplo, a botânica, farmacologia e fitoquímica, que em conjunto enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial.

Este capítulo focaliza a prática da medicina tradicional com base na aplicação de plantas medicinais no tratamento de diversas patologias e como principal fonte de descoberta e inspiração de novas drogas terapêuticas. Ademais é exemplificado o uso fitoterapêutico de duas plantas medicinais originárias de diferentes culturas: *Camellia sinensis* e *Matricaria chamomilla*. *C. sinensis* é uma planta muito utilizada na medicina tradicional chinesa e está disponível em diversas formulações nas ervanárias. *M. chamomilla* é uma planta de uso medicinal, cosmético e alimentar da Europa Central.

2. As plantas e a medicina tradicional

Desde dos tempos mais remotos da história da Humanidade, as plantas medicinais são procuradas e utilizadas no tratamento de diversas patologias. Por exemplo, Hipócrates (século V a.c.) mencionou aproximadamente 300 a 400 plantas medicinais nos seus registos médicos; Dioscorides (século I d.c.) escreveu “*De Materia Medica*”, um género de tratado de plantas medicinais que descreve a utilização de numerosas espécies vegetais na prática medicinal; e algumas centenas de plantas estão descritas no “*Papyrus de Ebers*” (ano 1550 d.c.). A Bíblia é também um conjunto de oferece descrições de cerca de trinta plantas medicinais (Cowan, 1999). No entanto, a evolução da industrialização e o aumento na produção de compostos terapêuticos sintéticos, mais puros, activos e com menor efeitos colaterais ocasionaram uma preferência mundial pelos medicamentos farmacêuticos industrializados (Rates, 2001).

Actualmente, na civilização ocidental nota-se um retorno do interesse às plantas medicinais, devido ao aumento da procura de terapias alternativas. O que se deve ao uso abusivo ou incorrecto de drogas sintéticas; ao elevado custo de tratamentos farmacológicos convencionais; e à crença de que os produtos fitoterápicos são menos prejudiciais à saúde (Rates, 2001). Estima-se que, actualmente 50% dos fármacos das indústrias farmacêuticas ocidentais sejam baseados em conhecimentos etnomédicos das plantas e em compostos fitoquímicos (Ciocan, 2007). As plantas podem ser utilizadas na fitoterapia na forma de chás, extractos vegetais brutos ou como “fracções” enriquecidas em preparações fitofarmacêuticas (tinturas, extractos fluidos, pós, pílulas e cápsulas) (Rates, 2001; Balunas, 2005).

3. As terapias naturais em Portugal

As chamadas medicinas alternativas são conhecidas há vários séculos em todo o mundo. No entanto, tal como na maioria dos países europeus, nas últimas décadas tem-se registado em Portugal, sobretudo nos últimos quinze anos, um aumento significativo na procura destas terapias.

Este crescente interesse levou o Estado Português a legislar esta actividade. Assim, p Decreto-Lei nº 45/2003 de 22 de Agosto, faz um enquadramento base das terapêuticas não convencionais, reconhecendo como tal as seguintes: a homeopatia, a osteopatia, a fitoterapia, a naturopatia e a quiroprática. Nesta lei é também reconhecida a autonomia técnica e deontológica aos profissionais que praticam este tipo de terapias.

i. Legislação sobre medicamentos e fitoterapia

Os medicamentos de origem vegetal não estão isentos do cumprimento das garantias sanitárias. Para isso, Portugal conta com uma lei de 2006 que regulamenta as condições de fabrico e distribuição destes produtos. A normativa vigente defende o uso racional de todo o tipo de medicamentos, incluindo também os derivados directamente de plantas medicinais.

ii. Medicamentos em Portugal

A política sanitária portuguesa visa garantir a qualidade dos medicamentos e produtos sanitários, bem como de controlar o conjunto de actuações que garantam que os pacientes os recebem e utilizam de forma adequada às suas necessidades clínicas, nas doses precisas e durante o período de tempo adequado.

Estes objectivos estão presentes no Decreto-lei nº 176/2006, de 30 de Agosto, onde foram regulamentados o controlo de qualidade, a segurança e a eficácia, introdução no mercado e comercialização para consumo humano.

Este Decreto-lei assegurou a harmonização da normativa nacional com o Regulamento (CE) nº 726/2004, onde se estabelecem os procedimentos comunitários para a autorização e o controlo dos medicamentos de uso humano e veterinário, e que institui, ainda, a Agência Europeia de Medicamentos.

O presente Decreto-lei engloba os medicamentos tradicionais à base de plantas, como se pode ler no artigo nº1: “O presente decreto-lei estabelece o regime jurídico a que obedece a autorização de introdução no mercado e suas alterações, o fabrico, a importação, a exportação, a comercialização, a rotulagem e informação, a publicidade, a farmacovigilância e a utilização dos medicamentos para uso humano e respectiva inspecção, incluindo, designadamente, os medicamentos homeopáticos, os medicamentos radiofarmacêuticos e os medicamentos tradicionais à base de plantas”. A secção VI é dedicada exclusivamente aos medicamentos tradicionais à base de plantas.

iii. Aprovação de medicamentos

A autoridade competente para a aprovação de medicamentos em Portugal é o INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P. Este organismo público está associado ao Ministério da Saúde e entre as suas funções figuram as de regular, supervisionar e fiscalizar os sectores dos medicamentos, garantindo a sua qualidade e segurança, de acordo com os mais elevados padrões de protecção da saúde pública; autorizar a comercialização de especialidades farmacêuticas; garantir o acesso de todos a medicamentos eficazes e seguros; estar em coordenação com a Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos (EMA).

O INFARMED também tem vindo a reforçar a protecção da saúde dos consumidores relativamente ao consumo de plantas medicinais. Por exemplo, em 2002, na Deliberação nº 238/2002, de 8 de Outubro, o INFARMED forneceu uma lista de 40 plantas cuja venda ao público é limitada ou proibida por motivos de toxicidade.

iv. Medicamentos de origem vegetal na Europa

As plantas medicinais gozam de um estatuto diferente em cada estado-membro e não se regem de acordo com uma regulamentação comum. Na Alemanha, a maioria dos preparados vegetais são medicamentos que devem ser aprovados pelo Instituto Nacional de Medicamentos e Produtos Médicos antes da autoridade competente os comercializar. Em Inglaterra, pelo contrário, os preparados vegetais não são considerados medicamentos mas suplementos alimentares, regulando-se de acordo com a legislação sobre alimentos. Outros países europeus, como a Suécia e a Dinamarca, criaram uma categoria própria denominada “remédios naturais”, com um processo de autorização simplificado. Actualmente, fazem-se estudos para unificar em toda a Europa o estatuto dos medicamentos de origem vegetal. Deste modo, futuramente será possível dispor de plantas curativas em todos os estados-membro da EU em igualdade de condições.

As plantas medicinais cuja eficácia e rigor estão cientificamente comprovados serão submetidos a um processo de autorização integral para adquirir a categoria de medicamento. A EU criou para isso uma nova directiva (2004/24/CE para a alteração da directiva 2001/83/CE). Esta nova lei europeia sobre Medicamentos entrou em vigor com a sua publicação no Boletim Oficial da EU. A nova directiva deve ser implementada no Direito nacional de cada país membro num prazo de 18 meses. No entanto, a qualidade deste tipo de medicamentos deve ser provada de acordo com as monografias vigentes na farmacopeia europeia ou na farmacopeia de cada estado. A

utilização tradicional destes medicamentos limita-se a determinados campos de aplicação e, regra geral, a sua posologia é mais reduzida. A sua segurança está garantida pela longa tradição de aplicações bem sucedidas. As autoridades podem exigir aos fabricantes todo o tipo de dados sobre a segurança dos medicamentos. Todos os medicamentos que forem autorizados desta forma na UE devem incluir a respectiva indicação no prospecto e na embalagem.

Existem comissões e grupos de trabalho como ESCOP, OMS e HMPWP que se dedicam no estabelecimento de critérios de avaliação para os medicamentos de origem vegetal. A ESCOP "*European Scientific Cooperative on Phytotherapy*" foi criada com o objectivo de estabelecer critérios de avaliação para os medicamentos de origem vegetal na Europa. Até agora os diferentes grupos de trabalho dos estados-membro da UE elaboraram 80 monografias positivas que possuem valor informativo e são mais exaustivas que as monografias preexistentes. A Organização Mundial de Saúde (OMS) publica monografias sobre plantas medicinais de todo o mundo, nas quais se descrevem os requisitos sobre a qualidade, eficácia e segurança das plantas curativas. Nos finais de 1980, a OMS desenvolveu uma série de directrizes para avaliar os medicamentos vegetais. No ano 2000 esta organização publicou directrizes gerais sobre o procedimento metódico de investigação da medicina tradicional. Existe um grupo de peritos que trabalha sob os auspícios da EMEA denominado de "*Herbal Medicinal Products Working Party*" (HMPWP). Em nome das autoridades europeias, estabelece as directrizes para avaliar a eficácia, rigor e qualidade dos medicamentos de origem vegetal que se baseiam nas monografias da OMS e ESCOP.

4. Importância das plantas na descoberta de novas drogas

Os benefícios medicinais das plantas resultam de combinações de produtos do metabolismo de uma planta (Ciocan, 2007). O sistema metabólico de uma planta é constituído por um conjunto de processos bioquímicos, cujo desempenho é distinguido em metabolismo primário e metabolismo secundário (Gurib-Fakim, 2006). O metabolismo primário está associado aos processos vitais da planta e que são comuns a todas as plantas. O metabolismo secundário é característico de cada espécie e é condicionado por diversos factores bióticos e abióticos originando uma multiplicidade de misturas de metabolitos (Gurib-Fakim, 2006). Os metabolitos primários e secundários são classificados com base na sua estrutura química. Os compostos secundários representam um recurso biogénico enorme para a descoberta de novos fármacos pela sua ampla diversidade (Gurib-Fakim, 2006).

Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo estudos químicos, farmacológicos e biológicos de plantas, com o intuito de obter novos compostos com propriedades terapêuticas. A descoberta de novas drogas continua a proporcionar novos e importantes alvos farmacológicos incluindo o cancro, o Alzheimer e as doenças infecciosas. O Instituto Nacional do Cancro, nos Estados Unidos, testou mais de 50000 amostras de plantas contra o vírus da SIDA e a actividade antitumoral de 33000 amostras (Rates, 2001). Diversas companhias farmacêuticas, como a Merck, a Glaxo e a Boehringer, possuem departamentos específicos dedicados ao estudo de novas drogas provenientes de fontes naturais. Alguns exemplos incluem a galantamina isolada de *Galanthus woronowii* que é uma droga utilizada no tratamento da doença do Alzheimer, retardando a degeneração neurológica, a influvinina que é um fármaco modificado proveniente de *Catharanthus roseus* e que possui propriedades anticancerígenas e a digitoxina e digoxina isoladas de *Digitalis purpúrea*, que são utilizados no tratamento de insuficiência cardíaca (Schmidt, 2008). As plantas têm fornecido numerosas drogas que são utilizadas na medicina convencional. Apesar de todos os desafios impostos à obtenção de produtos naturais a partir de plantas, pode ser prevista como um componente essencial na busca de novas drogas (Balunas, 2005).

5. Das plantas medicinais aos medicamentos

A fitoterapia moderna utiliza muitas plantas medicinais procedentes de culturas controladas. Assim consegue-se uma série de condições estáveis relativamente semelhantes. Estas condições dependem da localização e das características do solo, bem como da zona climática. Todos estes processos estão sujeitos a estritas medidas de controlo de qualidade e devem cumprir os padrões reconhecidos internacionalmente.

A cultura de plantas medicinais é efectuada em função da procura e da qualidade oferecida. A caracterização inequívoca da planta e das condições de crescimento, colheita e manipulação pós-colheita são cada vez mais padronizadas. Em Portugal, pouco tem sido feito para que a produção nacional de plantas medicinais seja equiparável à de outros países, onde a cultura, transformação e comercialização estão bastante desenvolvidas.

A colheita das plantas ricas em agentes activos deve ser efectuada no momento adequado. Frequentemente a fase de crescimento e a hora do dia são decisivas. Após a colheita devem ser cuidadosamente secas a temperatura ambiente que evita a volatilização de muitos fitocompostos. As plantas depois de secas devem ser

armazenadas em locais secos, frescos e escuros. Cada fase de elaboração e a qualidade do preparado final devem cumprir os requisitos da “Boa Prática de Fabrico” (GMP: Good Manufacturing Practice).

Os extractos vegetais são preparados e concentrados procedentes de material vegetal em estado seco ou fresco que são preparados com determinados solventes. Antes do processo de extracção as plantas são trituradas e por vezes é necessário a inactivação de enzimas ou a eliminação de lípidos.

A elaboração de extractos vegetais necessita de uma quantidade elevada de matéria-prima, uma vez que implica um processo de concentração que é traduzida pela proporção droga-solvente. Esta proporção indica a matéria-prima vegetal existente relativamente à quantidade do preparado. Esta proporção é referenciada com uma margem de variações que está relacionado com a variação natural. Ou seja, a potência de cada planta varia em função das condições climáticas, da colheita e do momento da colheita. Nas monografias de ESCOP estão publicadas as doses diárias recomendadas, em gramas.

6. Princípios activos vegetais mais importantes

A extracção de substâncias mais importantes é feita com solventes, sendo os mais comuns a água, o etanol e proporções destes dois solventes. Com os solventes muito aquosos obtêm-se substâncias polares. As substâncias apolares são extraídas com acetona, isopropanol ou etanol. Geralmente não existe um único princípio activo primário, sendo com proporções variáveis que são responsáveis pelo efeito do medicamento.

As plantas sintetizam uma variedade de metabolitos secundários os quais são depositados em órgãos vegetais específicos (Ciocan, 2007). Algumas destas substâncias fazem parte de mecanismos de defesa contra potenciais predadores, outras são responsáveis pelo odor ou pela pigmentação das plantas (Cowan 1999). De acordo com a sua estrutura química os metabolitos são divididos em fenóis, taninos, quinonas, flavonóides e alcalóides.

i. Fenóis simples

Alguns dos compostos bioactivos fitoquímicos mais simples consistem num único anel fenólico (Figura II.1). Os ácidos cafeico e cinâmico são os compostos que melhor representam este grupo, cujo estado de oxidação é máximo. O tomilho contém ácido



Figura II.2: Estrutura química básica do grupo das quinonas. Adaptado de Cowan (1999).

iii. Flavonóides

Os flavonóides são estruturas fenólicas com grupos hidroxilo nos carbonos 3 e 6 (Figura II.3). São produzidos pelas plantas em resposta a infecções microbianas obtendo-se métodos eficazes in vitro contra uma vasta gama de microrganismos. A sua actividade é devida à capacidade de formar complexos nas proteínas extracelulares solúveis e outros componentes das paredes celulares bacterianas. A actividade antimicrobiana dos flavonóides tem como principal alvo as membranas bacterianas (Cowan, 1999).

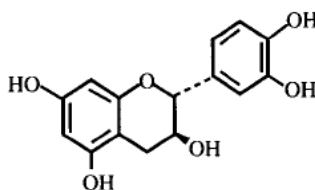


Figura II.3: A catequina é um exemplo de um composto flavonóide. Adaptado de Cowan (1999).

iv. Taninos

Tanino é um nome descritivo geral de um grupo de substâncias fenólicas poliméricas capazes de tornar castanho ou precipitar a gelatina a partir de uma solução, propriedade designada por adstringência. O seu peso molecular varia entre 500 e 3000 Da, estão presentes em quase todos os órgãos vegetais e estão divididos em dois grupos: taninos condensados e taninos hidrolizáveis (Figura II.4). Os taninos hidrolizáveis são derivados do ácido gálico, enquanto os taninos condensados são derivados de monómeros de flavonóides (Cowan, 1999). O seu modo de acção antimicrobiano é semelhante ao das quinonas, e está relacionado com a sua capacidade de inactivar adesinas bacterianas, enzimas celulares, proteínas transportadoras e complexar polissacarídeos (Cowan, 1999). Os taninos possuem

actividades fisiológicas, tais como a estimulação de células fagocitárias e actividade antitumoral (Ciocan, 2007).

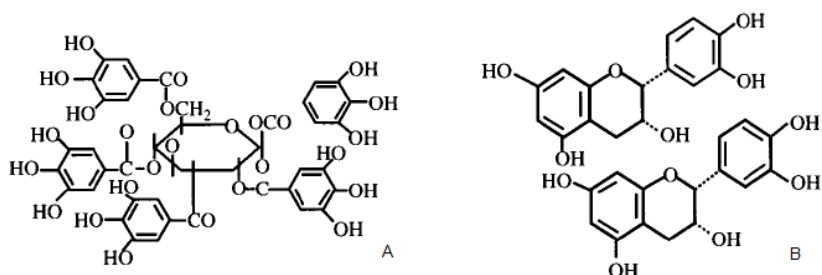


Figura II.4: Exemplos de tanino hidrolizado (A) e condensado (B). Adaptado de Cowan (1999).

v. Terpenos

Os terpenos são responsáveis pela fragrância das plantas e constituem a fracção dos óleos essenciais. Possuem uma estrutura química geral $C_{10}H_{16}$ e ocorrem como diterpenos, triterpenos e tetraterpenos (C_{20} , C_{30} e C_{40}), bem como hemiterpenos (C_5) e sesquiterpenos (C_{15}). Quando o composto contém um elemento adicional, normalmente o oxigénio, são designados de terpenóides (Cowan, 1999) (Figura II.5). Em 1977, foi registado que 60% dos derivados dos óleos essenciais inibem o crescimento de fungos, enquanto 30% inibem as bactérias (Cowan, 1999). O mecanismo de acção dos terpenos ainda não está esclarecido, no entanto especula-se que envolva a desintegração membranar.

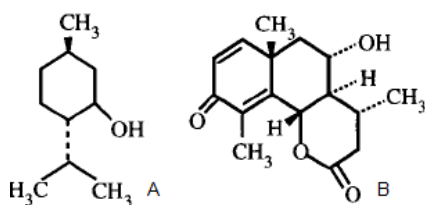


Figura II.5: Exemplo de dois terpenóides: A – mentol, B – artemisina. Adaptado de Cowan (1999).

vi. Alcalóides

Os alcalóides são compostos orgânicos heterocíclicos nitrogenados. Geralmente são extremamente tóxicos (Figura II.6). No entanto têm um efeito terapêutico

pronunciado em quantidades reduzidas (Ciocan, 2007). Portanto as plantas ricas em alcalóides são pouco utilizadas na medicina tradicional e apenas como aplicação tópica externa. Os alcalóides puros e os seus derivados sintéticos são utilizados como agentes básicos medicinais com efeitos antiespasmódico, analgésico e bactericida.

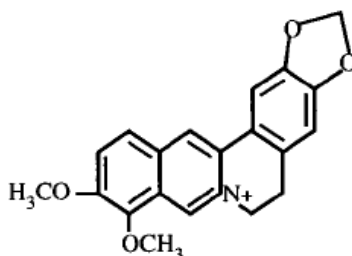


Figura II.6: A berberina é um exemplo do grupo dos alcalóides. Adaptado de Cowan (1999).

7. Mercados e consumidores

Cerca de oitenta por cento da população mundial depende de medicamentos elaborados com substâncias naturais. Mesmo em países ocidentais industrializados, onde os medicamentos químico-sintéticos ocupam um lugar dominante, os fitofármacos constituem um segmento relevante.

Na Europa os países com maior adesão à fitoterapia são a Alemanha e a França constituindo dois terços do mercado europeu (Figura II.7). Das 4000 plantas europeias conhecidas com propriedades farmacológicas, cerca de 500 são reconhecidas oficialmente como plantas medicinais. Portugal constitui um pequeno mercado no contexto europeu, essencialmente destinado para a importação e transferência de suplementos. No entanto, existe uma enorme tradição no uso de plantas medicinais não só como medicamento ou mesmo como suplemento alimentar. A exiguidade do mercado português relativo às plantas medicinais facilita a agregação do tecido empresarial em torno de dois grandes grupos, um ligado ao sector farmacêutico e outro ligado à indústria alimentar. Dados referenciados pela Associação Portuguesa de Alimentação Racional e Dietética indicam que cerca de 65% dos produtos vegetais são comercializados em farmácias e parafarmácias. O consumo de medicamentos à base de plantas medicinais tem aumentado nas últimas décadas.

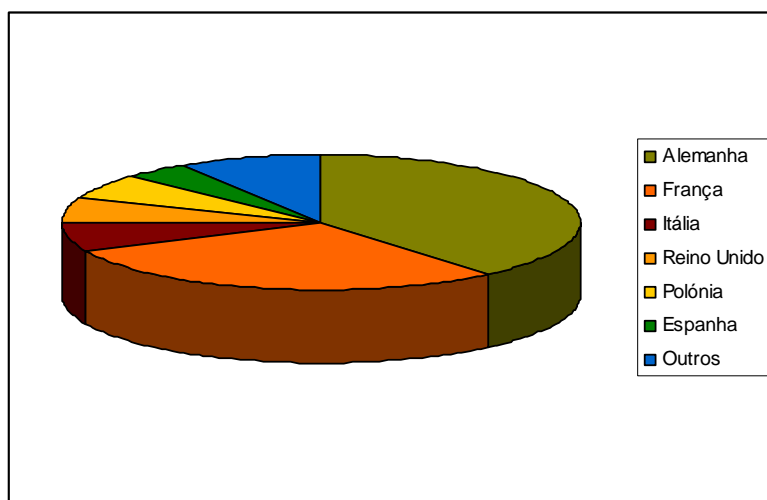


Figura II.7: Consumo de fitofármacos na Europa: quota de mercado 2001. Adaptado de Grünwald e Jänicke (2009)

8. *Matricaria chamomilla* e *Camellia sinensis*: origens, tradição e terapêutica

O chá é uma das bebidas mais populares em todo o mundo e o chá verde é obtido a partir de *Camellia sinensis* (L). Kuntze (Figura II.8). O chá verde é um arbusto da família *Theaceae* que atinge cerca de 10 a 15 metros de altura no estado selvagem e 0.6 a 1.5 metros em cultivo (Ivan, 2008). É uma planta nativa de China, cujo cultivo se difundiu na Índia e Japão e posteriormente na Europa (Sharangi, 2009). Na China o uso de chá verde remonta a 2700 anos a.c., enquanto na Europa apenas remonta no século XVI. Na medicina tradicional chinesa as folhas de *C. sinensis* são utilizadas no tratamento de asma, angina de peito e doença arterial coronária. As variedades de chá verde, *oolong* e preto derivam todos da mesma espécie, *C. sinensis*, no entanto diferem na sua aparência, tacto, sabor e conteúdo químico. Estas diferenças devem-se aos respectivos processos de fermentação da planta. O chá verde pode ser consumido na forma de chá ou cápsulas. Em alguns países o chá verde é utilizado como suplementos dietéticos. Esta planta possui actividades antioxidantes, antiinflamatórias, antimicrobianas e hepatoprotectoras (Hamilton-Miller, 1995).

As propriedades terapêuticas do chá verde atribuem-se principalmente aos compostos polifenólicos (Figura II.8), que incluem epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC), flavonóides e cafeína (Liu, 2008). Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os polifenóis do chá verde possuem actividade anticarcinogénica mediante a indução da apoptose e a inibição do crescimento celular de tumores (Liu

2008). Foi também avaliada a actividade antimicrobiana do chá verde, cujo extracto inibe e mata estirpes bacterianas de *S. aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Ivan, 2008). O extracto de chá verde também é efectivo contra espécies de *Trichophyton* e de candida, rotavírus e enterovírus, e alguns protozoários (Hamilton-Miller, 1995).

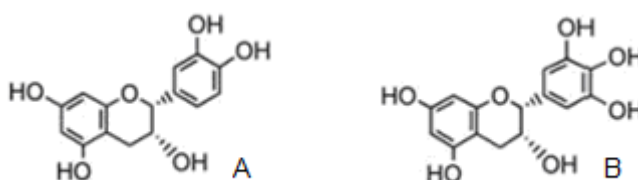


Figura II.8: Principais compostos fenólicos presentes no chá verde: A –epicatequina, B – epigallocatequina. Adaptado de Crozier *et al.* (1999).

A camomila (*Matricaria chamomilla* L.) é uma planta anual da família *Asteraceae*, que pode atingir 10 a 30 cm de altura (WHO, 1999). A camomila é uma planta originária do centro e norte da Europa, podendo surgir na Ásia ocidental, no norte de África e América do norte (Figura II.10). É tradicionalmente utilizada em preparações medicinais e farmacológicas pelas suas propriedades antiinflamatórias e antiespasmódicas (Harbourne, 2009). As partes mais utilizadas são as flores e as folhas. Além de ser uma planta ornamental possui propriedades calmantes, antiinflamatórias da pele e do sistema digestivo, suaviza e aclara os cabelos (WHO, 1999). Tradicionalmente as flores de camomila são preparadas em infusões para distúrbios digestivos e nervosos, ou em cremes tópicos no tratamento de queimaduras e eczema.

A camomila é frequentemente utilizada como uma planta medicinal devido aos seus diversos efeitos farmacológicos que são devidos à presença de compostos activos (Repčák, 2009). As flores da camomila contêm um óleo essencial (0.4 – 1.5%) que tem uma cor azul intensa: camazuleno e o α -bisabolol (Figura II.11), que constituem 50-65% do conteúdo volátil do óleo. Estudos recentes evidenciaram que as suas propriedades terapêuticas são devidas ao conteúdo fenólico (Harbourne, 2009). O conteúdo fenólico consiste em flavonóides (apigenina) e flavonas (glucósidos de luteolina e quercetina). A apigenina é um dos principais componentes presente nas flores de camomila (Harbourne, 2009) (Figura II.9). Os ácidos fenólicos, incluindo a cafeína e os ácidos clorogénicos, estão também presentes nas flores desta planta. Estudos prévios demonstraram que os flavonóides, nomeadamente a apigenina,

possuem propriedades anti-inflamatórias, bem como o conteúdo dos fenóis totais dos extractos de camomila. A apigenina possui a capacidade de inibir a cinases de induzir a indução da apoptose mediante a degradação proteossomal de células humanas cancerígenas (Repčák, 2009). Além disso possui actividade antibacteriana, antifúngica e antivíricas. Extractos de camomila inibem o crescimento do herpes vírus e o óleo de camomila é efectivo contra *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, e *Candida albicans* (WHO, 1999).

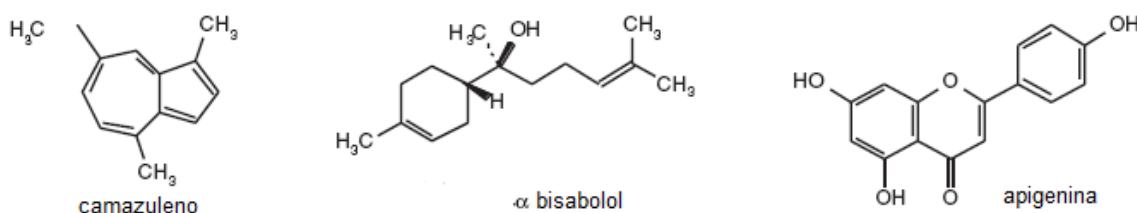


Figura II.9: Principais constituintes químicos nas flores da camomila. Adaptado de WHO (1999).

Aspalathus linearis (N.L.Burm) R. Dahlgren é um arbusto endémico da África do Sul, nomeadamente na província Western cape na região Cedarberg, e pertence à família Fabaceae (Joubert 2008). É mais conhecido por *rooibos* ou chá vermelho devido à coloração vermelha das folhas secas. O chá vermelho é muito apreciado pelas suas propriedades terapêuticas e cosméticas. Na prática da medicina tradicional a planta é empregue no alívio de cólicas infantis, no tratamento de alergias, asma e de problemas dermatológicos (Joubert 2008). Actualmente é muito utilizado em infusões como alternativa ao chá Oriental sendo muito apreciado como uma bebida refrescante. A sua produção comercial teve início em 1904 por Benjamin Ginsberg, no entanto, apenas nos últimos catorze anos o mercado internacional desta planta teve um aumento significativo, cuja exportação aumentou de 750 toneladas (1993) para 7200 toneladas em 2007 (Joubert 2008).

O chá vermelho é muito rico em compostos fenólicos, possui vestígios de alcalóides e é desprovido de cafeína (Joubert 2008). O principal constituinte das folhas do chá vermelho é a aspalatina, um composto polifenólico monomérico, que atribui as propriedades antioxidante, anticancerígena e antimutagénica de *rooibos in vitro*. (Joubert 2008).

Capítulo III: Avaliação da interacção dos extractos brutos com os antibióticos

1. Introdução

A necessidade de combater a resistência das bactérias face aos antibióticos é um conceito cuja importância tem vindo a aumentar. *S. aureus* é um microrganismo que tem vindo a exibir resistência a múltiplos antibióticos. A terapia de associações de antibióticos é uma das alternativas para o tratamento de estirpes bacterianas multirresistentes, produzindo efeitos sinérgicos desejáveis no tratamento de infecções bacterianas. Desde então a procura de novos antibióticos de várias origens tem vindo a aumentar. Com o intuito de potenciar a acção dos antibióticos já existentes, de modelar a resistência bacteriana ou simplesmente mediante a acção directa sobre a bactéria.

Actualmente existem inúmeros dados científicos que relatam a potencialidade antibacteriana de extractos de origem vegetal ou de compostos isolados (Mahady *et al.*, 2008). Estes compostos ou extractos vegetais brutos associados a antibióticos evidenciam uma interacção potencial planta-droga, que pode ser benéfica ou não. O benefício destas associações pode resultar em interacções de aditividade ou de sinergia, caso contrário resulta numa interacção antagonista ou tóxica (Hemaiswarya, 2008).

2. Compostos vegetais: agentes moduladores da multirresistência bacteriana

As plantas medicinais são uma fonte crucial de diversos compostos terapêuticos e com o aumento de estirpes multirresistentes (MR) o interesse por novas drogas ou preparados de origem vegetal tem vindo a aumentar. Os grupos problemáticos de bactérias MR incluem o *S. aureus* MRSA, entre outros, que resultaram do uso excessivo e indiscriminado de antibióticos. Os antibióticos mais comuns aos quais *S. aureus* MRSA adquiriu resistência são os β -lactâmicos e as fluoroquinolonas (Hemaiswarya, 2008). As bactérias desenvolveram vários mecanismos de resistência codificados em cromossomas, plasmídeos e transposões.

Os metabolitos secundários presentes nos extractos vegetais brutos ou isolados são excelentes fontes que podem actuar como agentes modificadores da resistência bacteriana, potenciando a actividade de um antibiótico ou mediante uma acção antibacteriana directa (Hemaiswarya, 2008; Gibbons, 2004). Considerando os vários mecanismos de resistência presentes nas bactérias e na especificidade da actividade dos extractos vegetais/fitocompostos é possível combater as bactérias multirresistentes mediante a: 1) inactivando a actividade das bombas de efluxo, 2) inibindo a actividade ou produção das β -lactamases, 3) sinergia entre fitocompostos e antibióticos, 5) alterando a virulência e patogenicidade da bactéria e 6) impedindo os mecanismos de transferência de genes (Figura III.1).

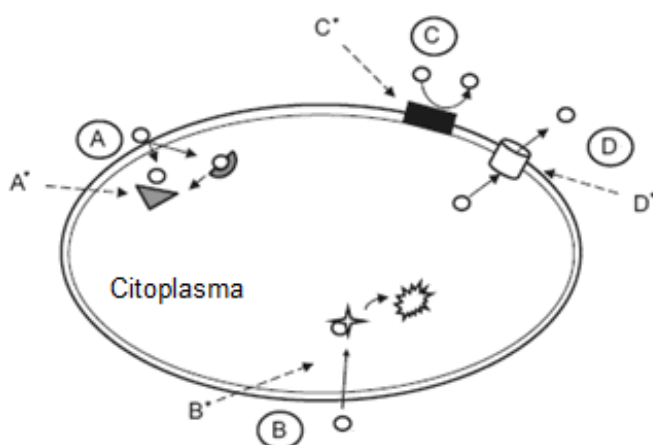


Figura III.1: Acção de fitocompostos como agentes modificadores da resistência bacteriana. A – Alteração do local activo do receptor, B – Degradação enzimática, C – Diminuição da permeabilidade, D – Inactivação das bombas de efluxo. Adaptado de Hemaiswarya (2008).

Presume-se que os extractos vegetais/fitocompostos que exibem uma forte actividade antibacteriana interajam sinergeticamente com antibióticos. Tais interacções são importantes na combinação da terapia antibacteriana (Ahmed, 2006). Foram reportados diversos estudos da combinação de extractos vegetais com antibióticos, que evidenciaram uma redução significativa da concentração mínima inibitória (CMI) de alguns antibióticos contra estirpes multirresistentes (Sibanda e Okoh, 2007).

3. Compostos vegetais com actividade antibacteriana contra *S. aureus*

Hamilton-Miller (1995) têm trabalhado muito sobre a capacidade de inibição de *S. aureus* MRSA de um grupo prolífico e dos constituintes do chá verde face à resistência à meticilina. Estes investigadores descreveram a capacidade de um “composto P” – a epigallocatechin gallate: EGCg - de inverter a resistência de *S. aureus* MRSA à meticilina. EGCg inibe especificamente a síntese das proteínas que se ligam à penicilina 2' (PBP2') de *S. aureus* (Gibbons, 2004). Na presença de um antibiótico este composto torna as estirpes de *S. aureus* MRSA sensíveis à meticilina e este facto foi comprovado por microscopia electrónica evidenciando que o “composto P” afecta a morfologia desta estirpe bacteriana resistente, enquanto as estirpes sensíveis de *S. aureus* à meticilina permanecem intactas. Este facto demonstra que o “composto P” inibe potencialmente a síntese de PBP2'.

Stermitz e Lewis estudaram o efeito sinérgico entre a berberina e o 5'-metoxihidnocarpina (5'-MHP) em estirpes de *S. aureus* e constataram que 5'-MHP potencia a actividade antibacteriana da berberina contra estirpes de *S. aureus* MRSA, uma vez que inibem o canal transportador de efluxo *NorA* (Gibbons, 2004). A espécie vegetal *Silybum marianum* contém uma substância que possui uma estrutura e efeito similares ao 5'-MHP, quando actua sinergeticamente com a berberina contra *S. aureus* MRSA. O ácido salicílico presente em algumas espécies vegetais, recentemente, mostrou induzir a redução da acumulação intracelular da ciprofloxacina. Uma característica fundamental destes e de muitos outros inibidores da multirresistência é a sua elevada lipoficidade na membrana bacteriana e a sua capacidade vinculativa para os canais transportadores de efluxo (Gibbons, 2004).

4. Objectivos

Face ao aumento de estirpes multirresistentes a procura de novas terapias antibacterianas tem vindo a aumentar. Presume-se que os extractos vegetais/fitocompostos que exibem uma forte actividade antibacteriana interajam sinergeticamente com antibióticos. Neste trabalho foram seleccionados seis isolados de *S. aureus* MRSA. Este grupo de isolados bacterianos foi o escolhido para aprofundar o estudo da sinergia/antagonismo da interacção dos extractos de camomila e chá verde com a penicilina G, vancomicina e oxacilina. Neste trabalho o principal objectivo centralizou-se no aumento da eficácia dos antibióticos em conjunto com os extractos no tratamento de infecções provocadas por *S. aureus* MRSA.

Deste modo, constituíram os seguintes objectivos para este estudo:

- ❖ Caracterizar os isolados de *S. aureus*;
- ❖ Avaliar a actividade antibacteriana dos extractos de camomila e chá verde contra *S. aureus*;
- ❖ Estudar a interacção dos respectivos extractos com a penicilina G, vancomicina e oxacilina contra *S. aureus*.

5. Material e métodos

i. Identificação dos isolados bacterianos de *S. aureus*

A primeira tarefa deste trabalho consistiu na obtenção de 91 isolados de *S. aureus* de origem ambulatoria provenientes de diversos produtos biológicos, entre Outubro e Dezembro de 2008. Procedeu-se à identificação de cada isolado de *S. aureus* mediante a técnica de coloração de Gram, cultura em meio de Chapman, testes da catalase e coagulase. Adicionalmente foi considerado o perfil de resistência e sensibilidade dos isolados de *S. aureus*. Em anexo encontra-se uma tabela na qual está a caracterização e identificação dos isolados e o respectivo perfil de sensibilidade.

a. Coloração de Gram

A coloração de Gram, desenvolvida em 1884 pelo médico dinamarquês Christian Gram, é um dos métodos de coloração mais aplicados em Bacteriologia. Trata-se de um método de coloração diferencial, dado que permite dividir as bactérias em Gram negativo e Gram positivo.

A parede celular das bactérias de Gram negativo contém um teor lipídico elevado na sua membrana externa, para além de uma camada fina de peptidoglicano que circunda a membrana plasmática. Portanto, durante o passo de diferenciação pelo álcool, onde os lípidos são dissolvidos, formam-se poros na parede por onde o corante primário (violeta de cristal) sai das células. Estas células ficam transparentes, após este passo, ficando posteriormente coradas de rosa pelo corante secundário (safranina). A parede celular das bactérias de Gram positivo é constituída principalmente por uma camada espessa de peptidoglicano e o seu teor lipídico é nulo ou muito reduzido. A camada de peptidoglicano actua como uma barreira impedindo a saída do corante primário e estas células ficam coradas de violeta.

Procedimento:

- Colocar uma gota de suspensão microbiana e estender o esfregaço;
- Secar e fixar à chama;
- Cobrir o esfregaço com o violeta de cristal e deixar repousar durante 1-2 minutos;
- Escorrer o corante e lavar o esfregaço com água corrente;

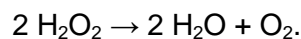
- Remover o excesso de água e cobrir com o soluto de lugol. Deixar actuar 1-2 minutos;
- Lavar com água corrente;
- Escorrer e lavar com álcool-acetona até não ser arrastado mais corante;
- Cobrir o esfregaço com safranina durante 2-3 minutos;
- Lavar com água corrente e deixar secar;
- Observar ao microscópio com a objectiva de maior ampliação (100x).

b. Cultura em meio de Chapman

É um meio destinado ao isolamento e diferenciação de estafilococos, uma vez que possuindo uma elevada concentração salina (7.5% NaCl) inibindo a maior parte dos microrganismos. A fermentação do manitol, presente no meio, por *S. aureus* irá acidificar o meio que passa de vermelho a amarelo.

c. Teste da catalase

A catalase é uma enzima intracelular, presente na maioria dos organismos, que decompõe o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) segundo a seguinte reacção química:



O chamado teste da catalase é utilizado em microbiologia e consiste na detecção da catalase em bactérias, permitindo a distinção entre estafilococos e estreptococos. Uma gota de peróxido de hidrogénio a 3% (v/v) é colocada numa lâmina de microscópio; uma amostra (uma gota de cultura líquida do microrganismo a testar ou uma colónia colhida com uma ansa ou um palito) é então esfregada nessa gota. Caso surjam bolhas, o microrganismo é catalase positiva (possui catalase – estafilococos), caso contrário, é catalase negativa (estreptococos). As bolhas são formadas pelo oxigénio molecular libertado na reacção da catalase.

d. Teste da coagulase

O *Slidex Staph Plus* (Biomérieux) é um teste de aglutinação de partículas de látex para a identificação de estirpes de *S. aureus*. A presença de anticorpos monoclonais dirigidos contra estruturas periféricas de *S. aureus* traduz a elevada especificidade e sensibilidade do teste. A aglutinação das partículas de látex traduz um resultado

positivo (produção de coagulase) e a não aglutinação é característico de outras espécies de estafilococos (coagulase negativa).

ii. Teste de sensibilidade a antimicrobianos

A determinação da sensibilidade de *S. aureus* aos antibióticos foi realizada segundo o método de difusão em disco, descrito por Kirby-Bauer (1966), seguindo as recomendações de *National Committee for Clinical Laboratory Standards* – NCCLS (2002). Para a padronização do inóculo foi feita uma suspensão bacteriana com turvação segundo a escala 0.5 de McFarland. Os discos de antibióticos impregnados (BD – Difco) foram a penicilina G, oxacilina/meticilina, vancomicina, teicoplanina, ciprofloxacina, ofloxacina e eritromicina.

Procedimento:

Meio de cultura

- O meio de cultura utilizado foi agar Mueller-Hinton;
- O pH do meio deve ser 7,2 a 7,4;
- A altura do meio deve ser de 4mm
- As placas devem ser armazenadas a 4°C;

Preparação do inóculo

- A partir de uma cultura pura seleccionar 4-5 colónias;
- Tocar no centro de cada colónia e preparar uma suspensão bacteriana com uma turvação de 0.5 segundo a escala de McFarland;

Inoculação das placas

- Mergulhar uma zaragatoa no inóculo, retirar o excesso de líquido e semear por estrias apertadas em três ou mais direcções;
- Deixar secar o inóculo 3-4 minutos;
- Distribuição dos discos de antibióticos
- Retirar as embalagens dos discos de antibióticos e deixar atingir a temperatura ambiente;
- Os discos são distribuídos na superfície do meio inoculado com um dispensador mecânico;

Leitura dos resultados

- Após o período de incubação (18 a 24 horas) medir os halos de inibição com uma régua (mm)
- As estirpes bacterianas são classificadas em sensível, intermédio ou resistente de acordo com o diâmetro do halo de inibição.

❖ Antibióticos testados para *S. aureus*

Tabela III.1: Antibióticos testados para estirpes de *S. aureus*.

Penicilinas	Pencilina G	
	Meticilina/oxacilina	
Cefalosporinas	1ª geração	Cefradina; Cefazolina
	2ª geração	Cefoxitina; Cefuroxima
	3ª geração	Cefodizina; Ceftazidina
	4ª geração	Cefepima
Cabapenemos	Imipenemo	
Amoxicilina + Ácido clavulâmico		
Aminoglicosídeos	Amicacina	
	Gentamicina	
	Tobramicina	
	Netilmicina	
Quinolonas	Ciprofloxacina	
	Norfloxacina	
Sulfometaxazol + Trimetropim		
Macrólidos	Eritromicina	
Glicopéptidos	Vancomicina	
	Teicoplamina	

iii. Avaliação da actividade antibacteriana de extractos vegetais brutos

A terapia de associações de antibióticos é uma das alternativas utilizadas empiricamente no tratamento de infecções provocadas por bactérias multirresistentes. Face ao aumento de bactérias multirresistentes a procura de novos compostos, como os de origem vegetal, com propriedades antibacterianas é uma das novas apostas da terapia antibacteriana.

A previsão de sinergia que poderá existir entre as drogas comerciais e os produtos vegetais com base nos resultados dos testes *in vitro* é crucial. Estão disponíveis vários trabalhos científicos que descrevem a acção de fitocompostos como agentes antimicrobianos. A selecção de fitocompostos com actividade antibacteriana é uma área de grande importância, no entanto o isolamento de compostos capazes de modificar a resistência bacteriana é ainda mais crucial. Para superar a multiresistência bacteriana a antibióticos é utilizada uma terapêutica antibacteriana que resulta na combinação de antibióticos, como por exemplo o sulfametoxazol-trimetropim.

Para a avaliação da actividade antibacteriana dos respectivos extractos vegetais brutos, procedeu-se à selecção de seis isolados resistentes à meticilina/oxacilina. Estes isolados são o alvo do estudo de corrente trabalho, uma vez que são isolados que para além de serem resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos, podem apresentar resistências a outros antibióticos. Estes isolados apresentam resistência também às quinolonas, eritromicina e à amicacina. Observou-se que estes isolados evidenciam uma tendência para a multiresistência a antibióticos.

Na escolha do material vegetal foi realizada uma pesquisa bibliográfica com base na aplicação das plantas na prática da medicina tradicional, nas suas propriedades terapêuticas e principais compostos activos. No trabalho foram utilizadas três plantas medicinais de origens distintas: *Matricaria chamomilla*, *Camellia sinensis* e *Aspalathus linearis*, vulgarmente conhecidas como camomila, chá verde e chá vermelho, respectivamente.

❖ Material vegetal

As propriedades medicinais da camomila, do chá verde e do chá vermelho permitiram seleccionar estas plantas para a realização deste trabalho. As flores de camomila (*M. chamomilla*), as folhas do chá verde (*C. sinensis*) e do chá vermelho (*Aspalathus linearis*) foram compradas numa erva-à-venda local. Ambos os produtos estavam desidratados e devidamente identificados. O solvente utilizado neste trabalho foi álcool etílico a 70%. As respectivas diluições das soluções-mãe foram feitas com água destilada. As concentrações da solução-mãe de cada extracto é de 25 mg (planta seca)/ mL de solvente.

Procedimento:

Preparação dos extractos vegetais brutos

- Pesar 250 mg de cada planta (camomila, chá verde e chá vermelho);
- Adicionar 10 mL de álcool etílico 60%;
- Colocar em banho-maria os respectivos recipientes com a mistura durante 30 minutos a uma temperatura de 70°C;
- Deixar arrefecer à temperatura ambiente;
- Decantar e filtrar o sobrenadante;
- Armazenar os extractos a uma temperatura de 4°C.

Adição do extracto ao meio de cultura

- Preparar diluições que variam de 0,001% a 50%, a partir da solução-mãe do extracto bruto para cada planta;
- Na preparação do meio de Mueller-Hinton adicionar 1 mL de cada solução preparada a cada placa;
- Deixar solidificar;

Preparação do inóculo

- A partir de uma cultura pura seleccionar 4-5 colónias;
- Tocar no centro de cada colónia e preparar uma suspensão bacteriana com uma turvação segundo a escala de 0.5 de McFarland;

Inoculação das placas

- Mergulhar uma zaragatoa no inóculo, retirar o excesso de líquido e semear por estrias apertadas em três ou mais direcções;
- Deixar secar o inóculo 3-4 minutos;
- Incubação das placas
- Verificar se houve o não crescimento bacteriano, registando o resultado numa tabela.

iv. Avaliação da interacção entre os extractos e antibióticos

O método DAA (*Decimal assay for additivity*), descrito por Sanders *et al.* (1993) é um método fácil, económico e com boa reprodutibilidade, com o intuito de avaliar a interacção de dois compostos no crescimento de um microrganismo. Neste trabalho foi avaliada a interacção da camomila e do chá verde com a penicilina G, a oxacilina e a vancomicina, respectivamente. As soluções stock dos antibióticos foram preparadas no dia do ensaio especificado por Andrews (2001).

Neste estudo é determinado o Factor Biológico Equivalente (FBE) que corresponde ao valor intermédio da curva padrão correspondente a cada antibiótico e/ou extracto. A curva padrão é determinada pelo diâmetro da zona de inibição (expressa em mm) em função do \log_{10} do peso do respectivo composto. Após a determinação do FBE são preparadas as soluções stock em função do peso calculado a partir de equação da regressão linear, quer para os antibióticos como para os extractos (Sanders *et al.*, 1993).

a. Determinação do Factor Biológico Equivalente (FBE)

Procedimento:

Meio de cultura

- O meio de cultura utilizado foi agar Mueller-Hinton;
- O pH do meio deve ser 7,2 a 7,4;
- A altura do meio deve ser de 4mm
- As placas devem ser armazenadas a 4°C;

Preparação do inóculo

- A partir de uma cultura pura seleccionar 4-5 colónias;
- Tocar no centro de cada colónia e preparar uma suspensão bacteriana com uma turvação de 0.5 segundo a escala de McFarland;

Inoculação das placas

- Mergulhar uma zaragatoa no inóculo, retirar o excesso de líquido e semear por estrias apertadas em três ou mais direcções;
- Deixar secar o inóculo 3-4 minutos;

Preparação dos discos

- Preparar diluições seriadas a partir da solução-mãe do extracto bruto para cada planta e a partir da solução stock de cada antibiótico;
- Impregnar os discos com 10 µL de cada concentração preparada anteriormente;
- Deixar secar à temperatura ambiente durante 5-10 minutos;

Distribuição dos discos

- Colocar os discos anteriormente preparados na superfície do meio inoculado, com o auxílio de uma pinça esterilizada;
- Deixar à temperatura ambiente durante 30 minutos para facilitar a pré-difusão do extracto;
- Colocar em cada placa um disco impregnado com álcool 60%, como controle negativo;

Incubação das placas

- Medir os respectivos diâmetros da zona de inibição (DZI – mm), após um período de incubação de 18 a 24 horas;

Determinação do FBE

- Realizar um gráfico que expresse o \log_{10} do peso da droga em função do DZI (mm);
- Traçar uma curva-padrão para cada droga e a respectiva equação;
- Seleccionar o DZI mediano;
- Determinar o FBE de cada droga, a partir da respectiva curva-padrão;
- O FBE exprime o peso da droga utilizado na preparação das soluções stock para o estudo da interacção entre os extractos vegetais brutos e os antibióticos.

b. Interação dos extractos vegetais com os antibióticos

Após a determinação do FBE são preparadas soluções stock de cada composto. Foram preparadas combinações decimais de cada extracto vegetal com cada antibiótico, segundo descrito por Sanders *et al.* (1993) (Tabela III.2). Os resultados de cada combinação são representados em gráfico e o tipo de interação determinado: sinergia, indiferença e antagonismo.

Tabela III.2: Misturas decimais utilizadas no método DAA. Adaptado de Sanders *et al.* (1993).

Mistura decimal	Proporção decimal de BEF		Ratio (A:B)
	Droga A	Droga B	
0	1.0	0.0	10:0
1	0.9	0.1	9:1
2	0.8	0.2	8:2
3	0.7	0.3	7:3
4	0.6	0.4	6:4
5	0.5	0.5	5:5
6	0.4	0.6	4:6
7	0.3	0.7	3:7
8	0.2	0.8	2:8
9	0.1	0.9	1:9
10	0.0	1.0	0:10

Procedimento:

Meio de cultura

- O meio de cultura utilizado é agar Mueller-Hinton;
- O pH do meio deve ser 7,2 a 7,4;
- A altura do meio deve ser de 4mm
- As placas devem ser armazenadas a 4°C;

Preparação do inóculo

- A partir de uma cultura pura seleccionar 4-5 colónias;
- Tocar no centro de cada colónia e prepara uma suspensão bacteriana com uma turvação segundo a escala de 0.5 de McFarland;

Inoculação das placas

- Mergulhar uma zaragatoa no inóculo, retirar o excesso de líquido e semear por estrias apertadas em três ou mais direcções;
- Deixar secar o inóculo 3-4 minutos;

Preparação dos discos

- Preparar as misturas decimais a partir de cada solução stock de cada droga
- Impregnar os discos com 10 µL de cada concentração preparada anteriormente;
- Deixar secar à temperatura ambiente durante 5-10 minutos;

Distribuição dos discos

- Colocar os discos anteriormente preparados na superfície do meio inoculado, com o auxílio de uma pinça esterilizada;
- Deixar à temperatura ambiente durante 30 minutos para facilitar a pré-difusão do extracto;

Incubação das placas

- Medir os respectivos halos de inibição, após um período de incubação de 18 a 24 horas;

Avaliação da interacção

- Realizar um gráfico que expresse o diâmetro dos halos de inibição em função das misturas decimais.

Resultados e discussão

i. Origem dos isolados de *S. aureus* e resistência à meticilina

A primeira parte do trabalho engloba o isolamento e a caracterização dos isolados de *S. aureus*. Este estudo abrange o distrito de Aveiro, com excepção das zonas mais a norte (Espinho e São João da Madeira) e interior do distrito (Vale de Cambra e Arouca), no último trimestre de 2008. Como já foi referido anteriormente, a caracterização destes isolados é feita mediante a coloração de Gram, cultura em meio de Chapman e os testes da catalase e coagulase. Utilizando estas técnicas microbiológicas para a identificação e caracterização dos isolados, obtiveram-se 91 isolados de *S. aureus* no ambulatório, que estão descritos e identificados na tabela do anexo I. Estes isolados tiveram origem a partir de diversos produtos biológicos (Figura III.2). O presente estudo permitiu constatar que cerca de 75% das infecções provocadas por *S. aureus* são de origem genito-urinária, não tendo sido obtidos isolados do tracto respiratório superior, fezes e hemoculturas como agentes patogénicos. Do mesmo conjunto de isolados de *S. aureus*, cerca de 9% são resistentes à meticilina (MRSA). A escassez de informação relativamente a dados epidemiológicos semelhantes a este caso de estudo, a nível ambulatório, não permite comparar se existe um aumento ou diminuição da prevalência de *S. aureus* a nível ambulatório. No entanto, comparando estes dados com dados do ano de 2007 (EARSS), a prevalência de *S. aureus* MRSA é inferior aos dados a nível hospitalar (25 – 50%).

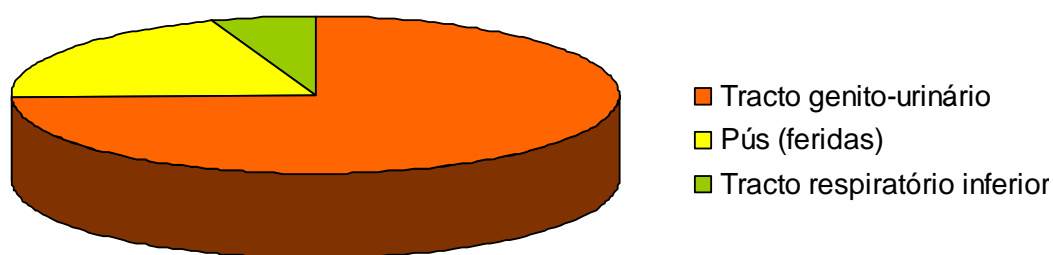


Figura III.2: Origem biológica dos isolados de *S. aureus*.

ii. Perfil de resistências de isolados de *S. aureus*

Para a avaliação do perfil de resistências dos 91 isolados de *S. aureus* foram realizados testes de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) (Figura III.3). Dos antibióticos utilizados para este estudo, a penicilina foi o antibiótico mais tolerado (42,9%), seguido pelas quinolonas (19,8%) e em igual proporção pela oxacilina, as cefalosporinas da 1ª geração e a eritromicina (8,8%). Não se observaram resistências às cefalosporinas de 3ª geração, vancomicina e teicoplanina. A resistência de *S. aureus* face à penicilina e à oxacilina poderá ser devida à sua utilização de forma empírica no tratamento de infecções (Gorwitz, 2008). Apesar de muitos estudos referirem que a prevalência da resistência de *S. aureus* à penicilina variar entre 65% - 70% (Gorwitz, 2008), neste trabalho verificou-se que é inferior (43%). Observamos que cerca de um quinto dos isolados são resistentes às quinolonas. Relativamente à oxacilina/meticilina verifica-se uma frequência de quase 9%, sendo estes isolados resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos, o que pode ser preocupante uma vez que o antibiótico geralmente usado empiricamente para o tratamento de infecções de *S. aureus* é a oxacilina, um antibiótico β -lactâmico.

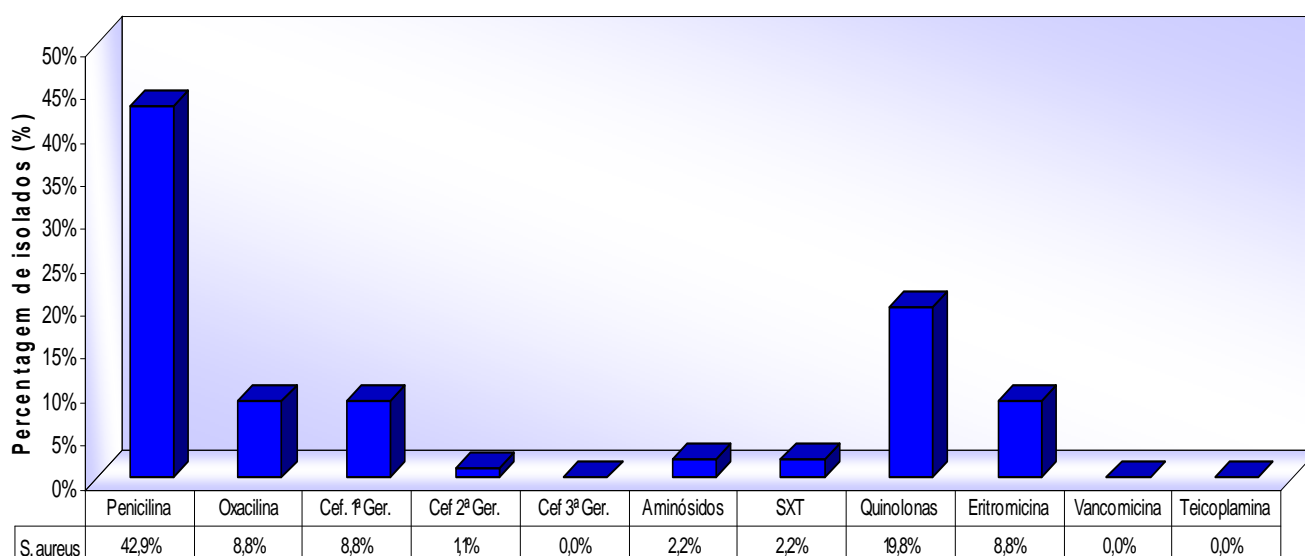


Figura III.3: Perfil de resistências de isolados de *S. aureus*, em ambulatório, no período de Outubro a Dezembro 2008.

iii. Avaliação da actividade antibacteriana dos extractos vegetais

De modo a encontrar novas formas de terapia que diminuam a utilização de antibióticos no tratamento de infecções *S. aureus* MRSA e aumentar a sua multiresistência, foi realizada uma pesquisa sobre outros tratamentos possíveis e verificou-se que a medicina homeopática usa extractos de plantas para tratar infecções deste tipo (Capítulo II). Os antibióticos geralmente provocam efeitos secundários indesejáveis, no caso da oxacilina, o antibiótico utilizado no tratamento de infecções por *S. aureus*, inclui como efeitos secundários irritação do sistema digestivo e hipersensibilidade às penicilinas. Deste modo, qualquer terapêutica que seja eficaz com menor concentração deste antibiótico é desejável. Assim procedeu-se à comparação do efeito de três extractos vegetais, descritos na bibliografia como tendo acção antibacteriana, camomila, chá verde e chá vermelho, sobre o crescimento de isolados de *S. aureus* MRSA. Para isso, seis isolados de *S. aureus* MRSA (consultar tabela em anexo I) foram submetidos a diferentes concentrações do extracto bruto das três espécies mencionadas. Em todos os ensaios foi realizado um controle negativo, mostrando que o solvente utilizado para preparar os extractos vegetais brutos, não interfere no crescimento bacteriano.

Podemos verificar que o chá vermelho não possui qualquer efeito inibitório no crescimento de *S. aureus* nas concentrações testadas (Tabela III.3). Este facto salienta que nem todas as plantas possuem poder antibacteriano contra isolados de *S. aureus* MRSA. Os compostos sintetizados pela planta não inibem o crescimento de *S. aureus* MRSA ou porque os compostos activos que possuem propriedades antibacterianas não são solúveis em etanol. Pelo contrário o extracto de chá verde e de camomila (Tabelas III.4 e III.5) induzem a inibição do crescimento de *S. aureus*, no entanto o extracto de chá verde possui maior poder antibacteriano que o extracto de camomila. Neste estudo observou-se que todos os isolados apresentaram sensibilidade ao extracto de chá verde na concentração de 10% (2,5 mg/mL) e que a sensibilidade decaiu à medida que diminui a concentração do respectivo extracto. Os mesmos isolados foram sujeitos a diferentes concentrações do extracto de camomila, tendo-se verificado que a maioria dos isolados apresentou sensibilidade ao extracto de camomila na concentração de 12,5% e que a sensibilidade dos isolados diminui com a diminuição da concentração do respectivo extracto (Tabela III.4). Estes resultados poderão estar relacionados com os compostos dissolvidos no extracto bruto de cada planta. A actividade antibacteriana do chá verde é segundo Hamilton-Miller (1995) devida ao seu conteúdo fenólico.

Tabela III.3: Avaliação da actividade antibacteriana do extracto de chá vermelho (25mg/mL). (+ crescimento confluyente; - ausência de crescimento; +/- pouco crescimento)

Nº isolado	Controlo da viabilidade	Controlo negativo	Concentrações placas (%)									
			50	25	10	5	1	0,5	0,25	0,125	0,025	0,001
10	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
65	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
77	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabela III.4: Avaliação da actividade antibacteriana do extracto de chá verde (25mg/mL). (+ crescimento confluyente; - ausência de crescimento; +/- pouco crescimento)

Nº isolado	Controlo da viabilidade	Controlo negativo	Concentrações placas (%)									
			50	25	10	5	1	0,5	0,25	0,125	0,025	0,001
10	+	-	-	-	-	+/-	+	+	+	+	+	+
11	+	-	-	-	-	+/-	+	+	+	+	+	+
18	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
43	+	-	-	-	-	+/-	+	+	+	+	+	+
65	+	-	-	-	-	+/-	+	+	+	+	+	+
77	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Tabela III.5: Avaliação da actividade antibacteriana do extracto de camomila (25mg/mL). (+ crescimento confluyente; - ausência de crescimento; +/- pouco crescimento)

Nº isolado	Controlo da viabilidade	Controlo negativo	Concentrações placas (%)									
			50	25	12,5	7,5	5	2,5	1	0,5	0,025	0,001
10	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
11	+	-	-	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+
18	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
43	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
65	+	-	-	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+
77	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

iv. Avaliação da interacção entre os extractos vegetais e os antibióticos

Tendo sido confirmada a actividade antibacteriana dos extractos de camomila e chá verde, em isolados de *S. aureus* MRSA, foram aplicados conjuntamente cada um dos extractos com antibióticos de modo a verificar a sensibilização da resistência dos isolados de *S. aureus* MRSA à penicilina e à oxacilina/meticilina. Como o extracto de chá vermelho não evidenciou qualquer actividade antibacteriana contra *S. aureus* MRSA foi excluído desta parte do trabalho. Para a avaliação da interacção entre os extractos e os antibióticos foi escolhido o isolado MRSA mais resistente - isolado número 77.

No estudo da interacção do extracto de camomila com a vancomicina observa-se uma relação irregular (Figura III.4 - A) impossibilitando avaliar de uma forma coerente a interacção existente entre o extracto de camomila e a vancomicina. A avaliação da interacção entre a camomila e a oxacilina expressa uma curva de acção sinérgica a partir da combinação 6:4 (camomila:oxacilina) cujo máximo de eficácia é verificado na proporção de 8:2 (Figura III.4 - B). Esta curva evidencia sinergia entre estes compostos em proporções de camomila mais elevadas. Relativamente à interacção entre a camomila e a penicilina verifica-se uma tendência para uma interacção sinérgica, apesar de ser uma curva bastante variável e portanto pouco fiável.

Em relação à avaliação da interacção do chá verde com os três antibióticos podemos verificar que existe uma interacção positiva nos três casos (Figura III.5). No caso da interacção do chá verde com a vancomicina (Figura III.5 - A) é claramente evidente que a aplicação conjunta do extracto de chá verde potencia a acção deste antibiótico, sendo expressa por uma curva em forma de sino, onde os melhores efeitos são obtidos para concentrações idênticas de chá verde e de antibiótico. A interacção entre o chá verde e a oxacilina (Figura III.5 - B) exhibe maior sinergia nas proporções com maior concentração do antibiótico. Portanto temos melhor resposta da inibição do crescimento deste isolado para concentrações mais baixas de chá verde. Em relação à avaliação da interacção do chá verde com a penicilina (Figura III.5 - C), verifica-se um efeito oposto ao anterior, em que existe uma interacção sinérgica mais eficaz em concentrações mais elevadas de chá verde. A diferença dos resultados obtidos com as diferentes proporções de chá verde com cada antibiótico poderá estar relacionada com o modo de acção de cada antibiótico, potenciando o seu efeito.

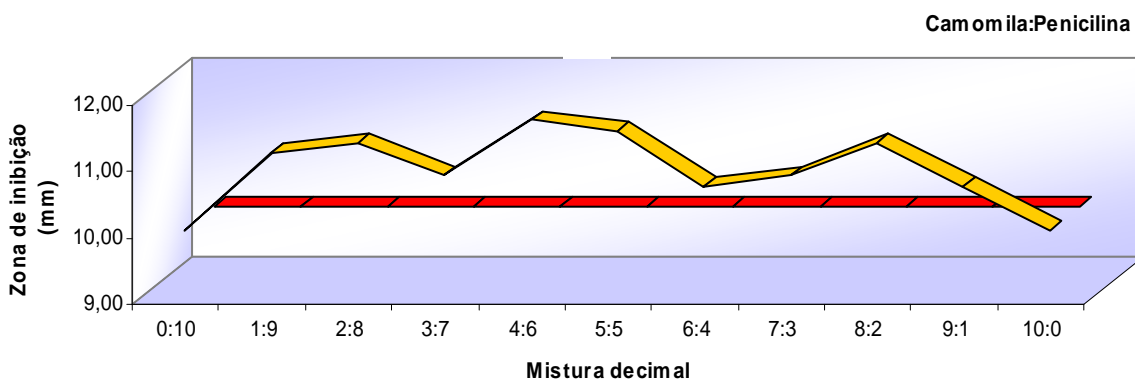
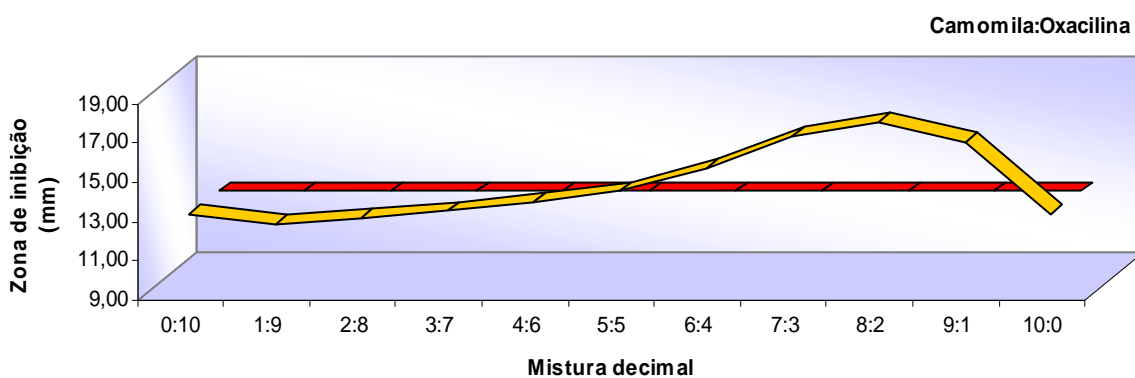
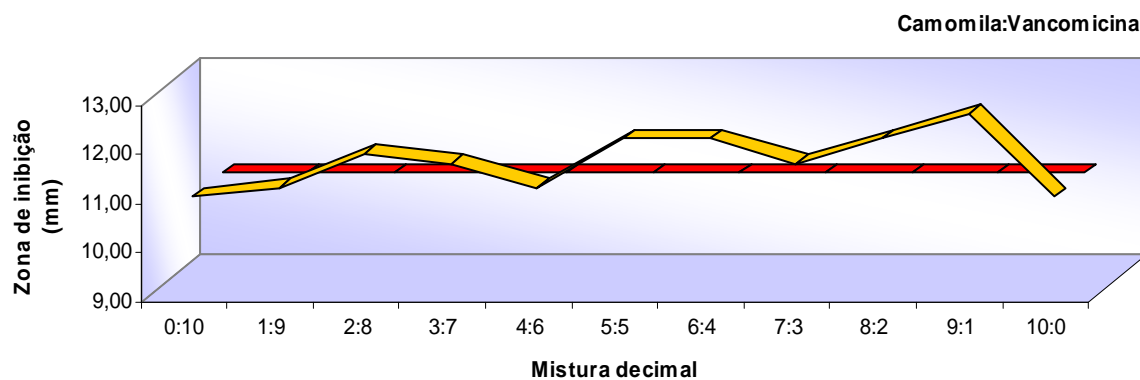


Figura III.4: Interação entre a camomila e antibióticos, segundo o método DAA: camomila:vancomicina (A); camomila:oxacilina (B); camomila:penicilina (C). Os valores são médias de seis réplicas. A linha horizontal define o halo de inibição do antibiótico testado isoladamente

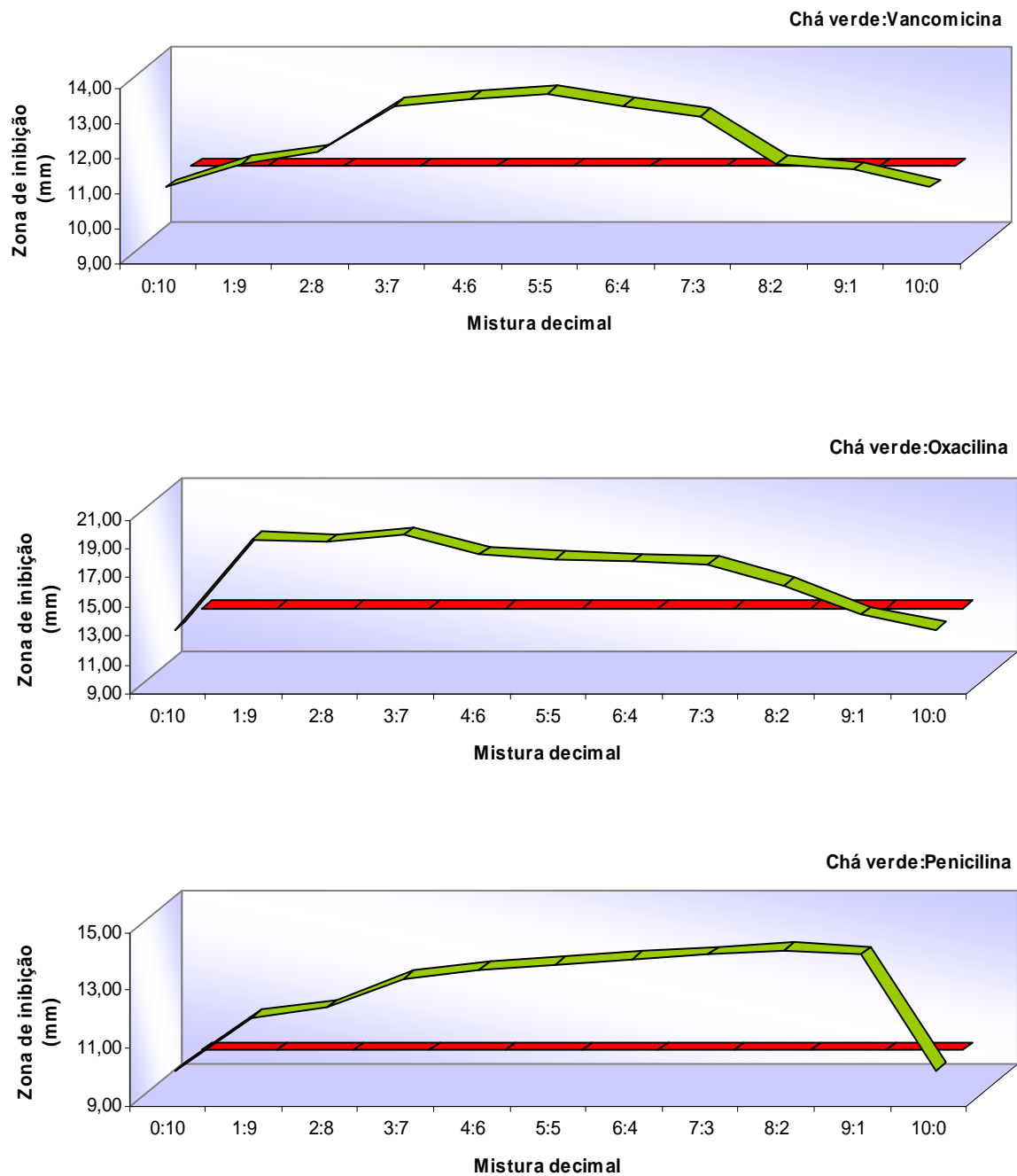


Figura III.5: Interação entre o chá verde e antibióticos, segundo o método DAA: chá verde:vancomicina (A); chá verde:oxacilina (B); chá verde:penicilina (C). Os valores são médias de seis réplicas. A linha horizontal define a zona de inibição do antibiótico testado isoladamente.

6. Conclusão:

Face ao aumento da prevalência global de isolados de *S. aureus* MRSA, as infecções provocadas por este tipo de bactéria representam um grave problema epidemiológico. Um dos objectivos do presente trabalho foi elaborar um pequeno estudo epidemiológico restringido a uma parte do distrito de Aveiro, num período entre 1 de Outubro e 31 de Dezembro 2008; e realizar o respectivo perfil de resistências dos mesmos isolados. Verificou-se que a maioria dos isolados de *S. aureus* é obtida maioritariamente a partir de infecções do tracto genito-urinário. Do estudo do perfil de resistências de *S. aureus* verificamos uma grande diversidade nas resistências dos isolados, dos quais 9% são resistentes à metilicina, antibiótico frequentemente utilizado no tratamento deste tipo de infecções.

A necessidade de combater a múltipla resistência de *S. aureus* MRSA conduziu diversos investigadores a estudar novas formas de terapia a este agente patogénico. De modo a encontrar novas formas de terapia que diminuam a utilização de antibióticos no tratamento de infecções de *S. aureus* MRSA, foi realizada uma pesquisa sobre outros tratamentos possíveis e verificou-se que tradicionalmente são utilizados extractos vegetais no tratamento de infecções deste tipo de bactérias. A associação de compostos vegetais com antibióticos e poderá ser uma das formas de potenciar a acção de antibióticos já existentes, de modo a tratar *S. aureus* sem recorrer a novas substâncias com acção antibacteriana e que em pouco tempo terão de ser substituídas devido à rápida aquisição de resistência a novas drogas pelos agentes bacterianos. Verificou-se que os extractos brutos de camomila e de chá verde possuem propriedades antibacterianas sobre isolados de *S. aureus*, ao contrário do extracto de chá vermelho, tendo o extracto de chá verde evidenciado maior poder antibacteriano que a camomila contra *S. aureus* MRSA. A avaliação do efeito dos extractos na modelação da resistência, à penicilina e à oxacilina, antibióticos aos quais estes isolados são resistentes. Foi confirmado que a camomila evidencia algum efeito potenciador destes antibióticos. No entanto, foi o extracto de chá verde que evidenciou um efeito sinérgico mais evidente. Estes resultados poderão constituir a base de investigação subsequente no sentido de produzir novos fármacos eficazes no tratamento de infecções por *S. aureus*, de forma a isolar os principais compostos activos e realizar estudos direccionados na investigação dos mecanismos de acção envolvidos.

ANEXO I

Tabela A: Identificação e caracterização dos isolados obtidos no ambulatório, entre Outubro e Dezembro 2008.

Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Produto biológico	P	U	O	U	U	U	U	U	U	P	P	U	U	U	U	U	U	T	U	U	P	U	U	U	U
Colorção de Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentação do manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Teste catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Teste coagulase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Antibióticos																									
Penicilina	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	S
Oxacilina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Cefradina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Cefazolina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Cefoxitina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Cefuroxima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Ceftazidina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Cefotaxima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Cefepima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Imipenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Ácido clavulânico + amoxicilina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Amicacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Netilmicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tobramicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Norfloxacina	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S
Ciprofloxacina	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S
Nitrofurantoina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Sulfametoxazol + trimetoprim	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Eritromicina	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Teicoplanina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Vancomicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Tabela A: Identificação e caracterização dos isolados obtidos no ambulatório, entre Outubro e Dezembro 2008 (continuação).

Isolados	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Produto biológico	U	U	U	U	U	U	P	U	U	U	P	U	U	U	U	U	U	P	U	U	U	U	U	U	U
Colorção de Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentação do manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Teste catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Teste coagulase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Antibióticos																									
Penicilina	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R
Oxacilina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Cefradina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R
Cefazolina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R
Cefoxitina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Cefuroxima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Ceftazidina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Cefotaxima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Cefepima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Imipenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Ácido clavulânico + amoxicilina	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicina	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Amicacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Netilmicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tobramicina	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Norfloxacina	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R
Ciprofloxacina	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R
Nitrofurantoina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Sulfametoxazol + trimetoprim	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Eritromicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Teicoplanina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Vancomicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Tabela A: Identificação e caracterização dos isolados obtidos no ambulatório, entre Outubro e Dezembro 2008 (continuação).

Isolados	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
Produto biológico	U	U	P	U	U	P	U	U	U	U	U	U	U	U	T	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Colorção de Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentação do manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Teste catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Teste coagulase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Antibióticos																									
Penicilina	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R
Oxacilina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefradina	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Cefazolina	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Cefoxitina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefuroxima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ceftazidina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefotaxima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefepima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Imipenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ácido clavulânico + amoxicilina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Amikacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Netilmicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tobramicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Norfloxacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S
Ciprofloxacina	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
Nitrofurantoina	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
Sulfametoxazol + trimetoprim	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
Eritromicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Teicoplanina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Vancomicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Tabela A: Identificação e caracterização dos isolados obtidos no ambulatório, entre Outubro e Dezembro 2008 (continuação).

Isolados	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91
Produto biológico	U	P	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	O	P	T
Colorção de Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentação do manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Teste catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Teste coagulase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Antibióticos																
Penicilina	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	R
Oxacilina	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Cefradina	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R
Cefazolina	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R
Cefoxitina	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Cefuroxima	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Ceftazidina	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Cefotaxima	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Cefepima	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Imipenem	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Ácido clavulânico + amoxicilina	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Amicacina	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Netilmicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tobramicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Norfloxacina	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Ciprofloxacina	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Nitrofurantoina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Sulfametoxazol + trimetopim	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Eritromicina	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Teicoplanina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Vancomicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Legenda: U-urina; P-pú; T-trocarter; O-ouvido; R-resistente; S-sensível; resistência à metilicina/oxacilina.

Bibliografia

- Andrews Jennifer (2001) "Determination of minimum inhibitory concentrations"; Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48:, S1 5-16.
- Ahmed I., Aqil F. e Owais M. (2006) "Modern phytomedicine – Turning medicinal plants into drugs"; 1ª edição; Wiley-VCH.
- Archer Gordon (1998) "*Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen". Clinical infectious diseases 26:1179-1181.
- Balaban, N. e Rasooly, A. (2000) "Staphylococcal enterotoxins". International Journal of Food Microbiology 61: 1-10.
- Balunas M. e Kinghorn D. (2005) "Drug discovery from medicinal plants"; Life sciences 78: 431 – 441.
- Brooks G., Butel J. e Morse S. (2001) "Jawetz, Melnick e Adelberg's: Microbiologia médica" McGraw Grill; 22ª edição; Rio de Janeiro
- Chongtrakool P., Ito T., Ma X., Kondo Y., Trakulsomboon S., Tiensasitorn C., Jamklang M., Chavalit T., Song J. e Hiramatsu K. (2006) "Staphylococcal Cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC*mec* elements". Antimicrobial agents and chemotherapy 50:1001-1012
- Ciocan I. e Băra I. (2007) "Plant products as antimicrobial agents"; Analele Stiintifice ale Universitatii Alexandru Ioan Cuza, Tomul VIII, 151- 156
- Cohen M. (2000) "Changing patterns of infectious disease." Nature 406(6797): 762-767.
- Cowan M. (1999) "Plant products as antimicrobial agents" Clinical Microbiology Reviews, 12: 564-582.
- Crozier A., Clifford M. e Ashihara H (2006) "Plant secondary metabolism: occurrence, structure and role in the human diet" Blackwell publishing 1ªedição p. 264.
- DeLeo F., Diep B e Otto M (2009) "Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections" Infectious Disease Clinics of North America, 23:17-34.
- Dewick P. (2002). "Medicinal natural products – A biosynthetic approach"; segunda edição; Wiley, pp.

- Dinges M., Paul M. e Schlievert P. (2000) "Exotoxins of *Staphylococcus aureus*". Clinical Microbiology Reviews 13: 16-34.
- Dubin, G. (2002) "Extracellular proteases of *Staphylococcus spp*". Biological Chemistry 383: 1075-86.
- Emmerson A. e Jones A. (2003) "The quinolones: decades of development and use" Journal of Antimicrobial Chemotherapy 51(S1):13-20.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARRS) (2007) "EARRS Annual report 2007"
- Fluit A., Visser M. e SchimdtzF. (2001) "Molecular detection of antimicrobial resistance" Clinical Microbiology Reviews 14:836-871.
- Gibbons S. (2004) "Anti-staphylococcal plant products"; Natural Product Reports 21:263 – 277.
- Gold H. e Pillai S. (2009) "Antistaphylococcal agents" Infectious Disease Clinics of North America, 23:99-131
- Gordon R. e Lowy F. (2008) "Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection". Clinical infectious diseases 46(Supplement 5): S350-S359.
- Gorwitz R. (2008) "A review of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections". The Pediatric Infectious Diseases Journal 27: 1-7.
- Hamilton-Miller J. (1995) "Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.)". Antimicrobial Agents and Chemotherapy 39:2375-2377.
- Hemaiswarya S., Kruthiventi A. e Doble M. (2008) "Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases" Phytomedicine 15:639-652.
- Ito T., Katayama Y., Asada K., Mori N., Tsutsumimoto K., Tiensasitorn C. e Hiramatsu H. (2001) "Structural comparison of three types of staphylococcal chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*". Antimicrobial agents and chemotherapy 45(5):1323-1336.
- Ivan R (2008) "Medicinal plants of the world – volume 3: Chemical constituents, traditional medicinal uses". New Jersey 1st edition, Humana Press, pp.2 – 19.
- Joubert E., Gelderblom W., Louw A. e de Beer D. (2008) "South African herbal teas: *Aspalathus linearis*, *Cyclopia spp.* and *Athrixia phylicoides* – A review". Journal of ethnopharmacology 119: 375-412.

- Mahady G., Huang Y., Doyle B. e Locklear T. (2008) "Natural products as antibacterial agents"; Atta-ur-Rahman (Ed.) Studies in Natural Products Chemistry 35: 423-444.
- Masters P., O'Bryan T., Zurlo J., Miller D. e Joshi N. (2003) "Trimethopim-sulfamethoxazole revisited" Archives of Internal Medicine 163:402-410.
- NCCLS, 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twelfth informational supplement. NCCLS document M100-S12.
- Rates S. (2001) "Plants as a source of drugs; Toxicon" 39: 603 – 613
- Robinson D. e Enright M. (2003) "Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*". Antimicrobial agents and chemotherapy 47(12):3926-3934.
- Sanders C., Sanders E. e Molland E. (1993) "Decimal assay for additivity for drugs permits delineation of synergy and antagonism" Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 37:260-264
- Schaffer A. e Lee J. (2009) "Staphylococcal vaccines and immunotherapies" Infectious Disease Clinics of North America, 23:153-171.
- Sharangi A. (2009) "Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camelia sinensis* L.) – A review". Food Research International, pp.1-7.
- Schmidt B., Ribnicky D., Poulev A., Logendra S., Cefalu W. e Raskin I. (2008) "A natural history of botanical therapeutics; Metabolism Clinical and Experimental", 57(1): S3-S9.
- Shinefield H. e Ruff N. (2009) "Staphylococcal infections: A historical prespective" Infectious Disease Clinics of North America, 23:1-15.
- Sibanda T. e Okoh A. (2007) "The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potencial sources of antimicrobial and resistance modifying agents" African Journal of Biotechnology, 6(25):2886-2896.
- Simor A. e Daneman N. (2009) "*Staphylococcus aureus* decolonization as a prevention strategy" Infectious Disease Clinics of North America, 23:134-151
- Tenover, F. (2006). "Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria." American Journal of Infection and Control 34(5): S3-S10.
- Walsh C. (2000). "Antibiotics: actions, origins, resistance". Washington, D.C., ASM Press.
- WHO monographs on selectecd medicinal plants – volume 1, 1999. WHO, Genve, 1st edition, pp.86 - 94
- Yarwood, J., Bartels D., Volper E. e Gereenberg E. (2004) "Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms". Journal of Bacteriology 186: 1838-1850.